Supplemento ordinario alla "Gazzetta Ufficiale" n. 90 del 16 aprile 1992 - Serie generale

Spedizione in abbonamento postale - Gruppo I (70%)

PARTE PRIMA — Roma - Giovedì, 16 aprile 1992 — SI PUBBLICA TUTTI I GIORNI NON FESTIVI

DIREZIONE E REDAZIONE PRESSO IL MINISTERO DI GRAZIA E GIUSTIZIA - UFFICIO PUBBLICAZIONE LEGGI E DECRETI - VIA ARENULA 70 - 00100 ROMA
AMMINISTRAZIONE PRESSO L'ISTITUTO POLIGRAFICO E ZECCA DELLO STATO - LIBRERIA DELLO STATO - PIAZZA G. VERDI 10 - 00100 ROMA - CENTRALINO 85081

N. 67

MINISTERO DELLA SANITÀ

DECRETO MINISTERIALE 26 marzo 1992.

Attuazione della decisione n. 91/180/CEE concernente la fissazione di metodi di analisi e prova relativi al latte crudo e al latte trattato termicamente.

SOMMARIO

MINISTERO DELLA SANITÀ

DECRETI, DELIBERE E ORDINANZE MINISTERIALI

MINISTERO DELLA SANITÀ

DECRETO 26 marzo 1992.

Attuazione della decisione n. 91/180/CEE concernente la fissazione di metodi di analisi e prova relativi al latte crudo e al latte trattato termicamente.

IL MINISTRO DELLA SANITÀ

DI CONCERTO CON

IL MINISTRO DELL'AGRICOLTURA E DELLE FORESTE

Vista la decisione n. 91/180/CEE della Commissione del 14 febbraio 1991, concernente la fissazione di metodi di analisi e di prova relativi al latte crudo ed al latte trattato termicamente pubblicata nella Gazzetta Ufficiale CEE n. L 93 del 13 aprile 1991;

Visto l'art. 6, comma 8, del decreto ministeriale 14 maggio 1988, n. 212, pubblicato nel supplemento ordinario alla *Gazzetta Ufficiale* n. 142 del 18 giugno 1988 con il quale è stata recepita nell'ordinamento nazionale la direttiva del Consiglio n. 85/397/CEE del 5 agosto 1985 concernente i problemi sanitari e di polizia sanitaria negli scambi intracomunitari di latte trattato termicamente;

Visti gli articoli 5, comma 1, e 6, comma 3, della legge 3 maggio 1989, n. 169, concernente la disciplina del trattamento e della commercializzazione del latte alimentare vaccino;

Ritenuto di dover recepire nell'ordinamento nazionale le disposizioni che formano oggetto della sopracitata decisione della Commissione CEE;

Visto il parere della Commissione per la determinazione dei metodi ufficiali di analisi di cui all'art. 21 della legge 30 aprile 1962, n. 283, espresso nella seduta dell'11 giugno 1991;

Decreta:

Art. 1.

Sono approvati i metodi di analisi e di prova per il controllo del latte crudo e del latte trattato termicamente destinato all'alimentazione umana, riportati negli allegati.

Art. 2.

I procedimenti di analisi e prova da applicare come procedimento di riferimento per il latte crudo sono i seguenti:

determinazione del punto di congelamento;

conteggio dei microrganismi: tenore di germi a 30 °C;

conteggio delle cellule somatiche;

accertamento degli antibiotici e dei sulfamidici.

Art. 3.

I procedimenti d'analisi e prova da applicare come procedimenti di riferimento per il latte pastorizzato sono i seguenti:

determinazione del punto di congelamento;

determinazione dell'attività fosfatasica;

determinazione dell'attività perossidasica;

conteggio dei microrganismi: tenore di germi a 30 °C;

conteggio dei microrganismi: tenore di germi a 21 °C;

conteggio dei coliformi: conteggio delle colonie a 30 °C;

accertamento degli antibiotici e dei sulfamidici;

accertamento di microrganismi patogeni.

Art. 4.

I procedimenti di analisi e prove da applicare come procedimenti di riferimento per il latte UHT e per il latte sterilizzato sono i seguenti:

determinazione del punto di congelamento;

conteggio dei microrganismi: tenore di germi a 30 °C;

accertamento degli antibiotici e dei sulfamidici.

Il presente decreto darà pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* della Repubblica italiana.

Roma, 26 marzo 1992

Il Ministro della sanità
DE LORENZO

Il Ministro dell'agricoltura e delle foreste
GORIA

ALLEGATO 1

I. DISPOSIZIONI GENERALI

1. INTRODUZIONE

Sono descritte le disposizioni generali concernenti i reattivi, le apparecchiature, l'espressione dei risultati, la precisione e le relazioni di analisi. Le autorità competenti e i laboratori preposti ai prelievi e alle analisi del latte devono rispettare le disposizioni generali.

2. REATTIVI

2.1. Acqua

2.1.1. Tutte le volte che venga fatto riferimento all'acqua ai fini della soluzione, della diluizione o del lavaggio con acqua, salvo diverse indicazioni, deve essere impiegata acqua distillata, acqua deionizzata o acqua demineralizata di purezza almeno equivalente. Per l'analisi microbiologica l'acqua deve essere esente da sostanze che potrebbero interessare o influenzare la crescita di microrganismi nelle condizioni sperimentali.

2.1.2. Ove si parli, senza ulteriori precisazioni, di "soluzione" o di "diluizione", si intende "soluzione in acqua" o "diluizione con acqua".

2.2. Sostanze chimiche

Salvo altra indicazione, tutte le sostanze chimiche impiegate devono avere purezza analitica riconosciuta.

3. APPARECCHIATURA

3.1. Elenco delle apparecchiature

L'elenco delle apparecchiature dei vari metodi di riferimento comprende soltanto le apparecchiature destinate a particolari impieghi o che richiedono determinate specifiche.

3.2. Bilancia analitica

Per bilancia analitica si intende una bilancia con sensibilità di 0,1 mg.

4. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

4.1. Risultati

A meno che non sia specificato diversamente il risultato dichiarato nella relazione dell'analisi deve essere la media aritmetica dei valori ottenuti da due prove che soddisfino ai criteri di ripetibilità (5.1.) fissati per quel dato metodo. Qualora tali criteri non vengano rispettati occorre ripetere il saggio oppure dichiarare non valido il risultato.

4.2. Calcolo delle percentuali

Salvo altre indicazioni, i risultati devono essere calcolati come percentuale in massa del campione.

5. CRITERI DI PRECISIONE:
RIPETIBILITA' E RIPRODUCIBILITA'

5.1. I criteri di precisione adottati per i vari procedimenti sono cosi' definiti :

5.1.1. Ripetibilità (r) è il valore al di sotto del quale dovrebbe cadere la differenza assoluta tra due singoli risultati di prova ottenuti con lo stesso procedimento su campioni di materiali identici, nelle stesse condizioni (stesso operatore, stessa apparecchiatura, stesso laboratorio e a breve distanza di tempo).

5.1.2. Riproducibilità (R) è il valore al di sotto del quale dovrebbe cadere la differenza assoluta tra due singoli risultati di prova ottenuti con lo stesso procedimento su campioni di materiali identici, in condizioni differenti (differenti operatori, differenti apparecchiature, differenti laboratori e/o tempi).

5.1.3. A meno che non sia specificato diversamente i valori relativi ai criteri di ripetibilità e riproducibilità dati nelle condizioni relative a ciascun procedimento rappresentano intervalli al grado di affidabilità del 95 % secondo la definizione della norma ISO 5725:2 ed. 1986. Questi sono calcolati dai risultati di prove interlaboratorio riconosciute che sono state eseguite per valutare il procedimento. Per alcuni di questi procedimenti peró non sono state effettuate prove interlaboratorio. In tali casi si è provveduto a fare una stima dei valori della ripetibilità e della riproducibilità.

5.1.4. Le prove interlaboratorio e gli studi di cui al punto 5.1.3. dovrebbero essere programmati e svolti conformemente agli orientamenti internazionali.

6. RELAZIONE D'ANALISI

La relazione d'analisi deve specificare il metodo di analisi adottato ed i risultati ottenuti. Riporta inoltre nei particolari procedimenti seguiti che non sono specificati nel metodo di analisi o che sono facoltativi, come pure tutti i fattori che possono aver condizionato i risultati ottenuti. La relazione della prova riporta anche tutte le informazioni necessarie per la completa identificazione del campione.

II. CAMPIONAMENTO DEL LATTE CRUDO E DEL LATTE TRATTATO TERMICAMENTE

1. OGGETTO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Questo procedimento descrive il metodo di riferimento per il campionamento del latte crudo e del latte trattato termicamente. Tale metodo, cosi' come quelli per il trasporto e la conservazione dei campioni, si applica al latte crudo fornito direttamente dal produttore ed a quello crudo o trattato termicamente contenuto in cisterne adibite al deposito ed al trasporto.

I metodi di cui ai punti 2., 4.4., 5. e 6. si applicano al campionamento del latte trattato termicamente destinato al consumo diretto.

2. GENERALITA'

La campionatura del latte trattato termicamente contenuto in bidoni, cisterne, ecc. viene effettuata da personale specializzato appositamente addestrato.

Se del caso, le autorità competenti o il laboratorio di analisi provvedono a dare al personale una specifica formazione sulle tecniche di campionamento atte a garantire che il campione sia rappresentativo di tutta la partita e ad essa conforme.

Le autorità competenti o il laboratorio provvedono eventualmente ad addestrare il personale su come etichettare il campione per poterlo identificare senza errori.

3. APPARECCHI PER LA CAMPIONATURA

3.1. Generalità

L'attrezzatura per il campionamento deve essere fabbricato in acciaio inossidabile o in altro materiale equivalente sufficientemente robusto e realizzata in modo da servire adeguatamente allo scopo (miscelazione, campionamento, ecc.). Gli stantuffi e gli agitatori per mescolare i liquidi nei recipienti devono avere dimensioni tali da garantire un

adeguato rimescolamento del prodotto senza peró provocare lo sviluppo di rancidità. I mestoli devono essere provvisti di un solido manico sufficientemente lungo in modo da consentire il prelievo in qualsiasi punto del recipiente. La sua capacità non deve essere inferiore a 50 ml.

I recipienti destinati a contenere i campioni e i relativi coperchi devono essere di vetro oppure di un metallo o di una materia plastica adeguati.

I materiali con cui è realizzata l'attrezzatura per la campionatura (recipienti e coperchi compresi) non devono dare luogo ad alcuna interazione con il campione che possa alterare i risultati dell'esame. Tutte le superfici dell'attrezzatura per il campionamento e dei recipienti devono essere pulite ed asciutte, levigate e prive di fessure; gli spigoli devono essere arrotondati.

3.2. Attrezzatura di campionamento per l'analisi microbiologica

L'attrezzatura per il campionamento, recipienti inclusi, oltre a soddisfare ai requisiti del punto 3.1. deve essere sterile.

Se la stessa attrezzatura viene usata per più campionamenti successivi, essa deve essere pulita e sterilizzata dopo ciascun campionamento, conformemente alle istruzioni o ai requisiti del laboratorio di prova o delle autorità competenti, in modo da non condizionare i risultati degli esami successivi.

4. TECNICA DI CAMPIONATURA

4.1. Generalità

A prescindere dal tipo di saggio da effettuare, prima del campionamento il latte deve essere mescolato bene manualmente o meccanicamente.

Il campione deve essere prelevato subito dopo il mescolamento, quando il latte è ancora in movimento.

Se nella stessa operazione si preleva dalle cisterne più di un campione per prove diverse, quello destinato all'esame microbiologico va prelevato per primo.

Il volume del campione deve essere in rapporto con le esigenze dell'analisi. I recipienti usati per il campione devono avere una capacità tale da risultare quasi completamente riempiti dal campione stesso, in modo che prima della prova sia possibile mescolarne il contenuto, evitandone peró un eccessivo scuotimento durante il trasporto.

4.2. Campionamento manuale

4.2.1. Campionamento dal secchio o dal bidone

Per agitare, muovere rapidamente uno stantuffo su e giù nel secchio o nel bidone accertando che il latte sia ben rimescolato e che sul collo del bidone non aderisca della panna. Prelevare un campione rappresentativo dell'intera partita seguendo il procedimento descritto al punto 4.2.4.

4.2.2. Campionamento da cisterne o vasche di refrigerazione del latte presso la stalla

Omogeneizzare sufficientemente il latte agitandolo meccanicamente o manualmente.

Se il volume del latte è tale da non consentire l'impiego di un agitatore meccanico, agitare manualmente.

4.2.3. Campionamento da un recipiente di misura

E' di fondamentale importanza che il latte versato in un recipiente di misura venga opportunamente mescolato. Per essere sicuri che il grasso si distribuisca uniformemente puó essere necessaria un'ulteriore agitazione manuale o meccanica. Se il volume della partita da campionare è maggiore della capacità del recipiente, prelevare un campione rappresentativo dell'intera partita seguendo il procedimento descritto al punto 4.2.4.

4.2.4. Campionamento di una partita contenuta in più serbatoi

Quando la partita di latte da campionare è contenuta in più di un serbatoio, si preleva da ciasuno di essi un campione rappresentativo annotando la quantità di latte corrispondente. Se i campioni di ciascun serbatoio non debbono essere esaminati separatamente, mescolarli in quantità proporzionali al contenuto dei recipienti da cui erano stati effettuati i rispettivi prelievi. Dopo aver mescolato, prelevare uno o più campioni da queste quantità proporzionali.

4.2.5. Campionamento da grandi recipienti - serbatoi di stoccaggio da autocisterne e vagoni cisterna

4.2.5.1. Prima del campionamento mescolare il latte con un metodo adeguato.

Per mescolare il contenuto di grandi recipienti, dei serbatoi di stoccaggio, delle autocisterne o dei vagoni cisterna, si consiglia di ricorrere all'agitazione meccanica (4.2.5.2.).

La durata della mescolazione deve essere commisurata al periodo durante il quale il latte è rimasto a riposo. Occorre dimostrare che il metodo di mescolamento adottato in ciascun caso particolare è adeguato agli scopi dell'analisi da effettuare; il criterio di efficienza del mescolamento influisce sensibilmente sulla similarità dei risultati dell analisi effettuate su campioni prelevati da punti diversi della partita dallo scarico della cisterna ad intervalli regolari durante le operazion di svuotamento. Un metodo per mescolare il latte è considerato efficace se la differenza del tenore di grassi fra due campioni, prelevati in tal condizioni, risulta inferiore allo 0,1 %.

Nei grandi serbatoi provvisti sul fondo di uno scarico si puó avere in tale punto una piccola quantità di latte non rappresentativa di tutto il contenuto anche dopo aver proceduto al mescolamento. E' preferibile pertanto prelevare i campioni attraverso un passo d'uomo. Per i campion prelevati dallo scarico fare scorrere prima un quantitativo sufficiente di latte in modo da garantire che i campioni siano rappresentativi di tutta la partita.

4.2.5.2. Il contenuto dei grandi recipienti, dei serbatoi di stoccaggio, delle autocisterne o dei vagoni cisterna puó essere mescolato :

con un agitatore meccanico montato nel recipiente ed azionato da un motore elettrico;

- con un'elica o con un agitatore sospeso nel latte, azionati da un motore elettrico e montati nel passo d'uomo;
- nel caso di vagoni cisterna o di autocisterne facendo circolare il latte attraverso il tubo di trasferimento collegato alle pompe di scarico della cisterna e introdotto nel passo d'uomo.
- con aria compressa filtrata e pulita. In questo caso occorre ridurre al minimo la pressione e il volume dell'aria onde evitare lo sviluppo di rancidità.

4.3. Campionamento automatico o semi automatico

Per campionare il latte crudo consegnato dai produttori possono essere usate apparecchiature automatiche o semiautomatiche, conformemente alle istruzioni date da un laboratorio di analisi o da un'altra autorità competente.

Prima dell'uso, e successivamente ad intervalli regolari, tali apparecchiatura devono essere sottoposte alle prove previste dalle autorità responsabili. Occorre verificare l'adeguatezza dei procedimenti di campionamento per determinare :

- il volume minimo di latte raccolto che puó essere correttamente campionato;
- la percentuale di un qualsiasi trascinamento (che è correlato al volume minimo del campione);
- la capacità di fornire dopo corretta agitazione un campione rappresentativo dell'intero insieme.

Nell'operazione di campionamento il volume totale del campione di laboratorio rappresentativo della partita è di 1 litro. Questo volume si deve raccogliere sia nel campionamento manuale che automatico o semiautomatico.

Nel campionamento automatico o semiautomatico l'operazione di prelie vo deve essere eseguita a livello di un opportuno rubinetto inserito o inseribile nella linea di carico del latte nell'impianto. Questo dispositivo deve essere collegato alla linea del vapore o in maniera tale da poterlo sterilizzare prima del suo impiego. L'apertura del condotto può essere costituita da una valvola di tipo meccanico o a comando elettrico collegata ad un timer che a intervallo di tempo prestabilito possa far defluire in un vaso di raccolta un piccolo volume in modo da formare il campione rappresentativo.

4.4. Campionamento di latte trattato termicamente destinato al consumo diretto in confezioni al dettaglio

I campioni di latte trattato termicamente per il consumo diretto in confezioni al dettaglio devono essere costituiti da confezioni chiuse ermeticamente. I campioni devono essere prelevati il più presto possibile subito dopo il trattamento, se possibile dalla macchina confezionatrice o dalla cella frigorifera dell'impianto di trattamento. Per il latte pastorizzato si dovrà procedere al prelievo dei campioni il giorno stesso del trattamento.

I campioni devono essere prelevati per ciascun tipo di trattamento termico (pastorizzazione, UHT e sterilizzazione) in numero corrispondente alle analisi previste e conformemente alle istruzioni del laboratorio preposto alle analisi o di altre autorità competenti.

5. IDENTIFICAZIONE DEL CAMPIONE

Il campione deve essere contrassegnato secondo le modalità di cui all'articolo 7 del D.P.R. 26 marzo 1980, n. 327 (2).

6. TRASPORTO E DEPOSITO DEI CAMPIONI

Le istruzioni relative alle condizioni di trasporto e di deposito e al tempo che deve intercorrere tra il campionamento e l'analisi del latte devono essere fornite dal laboratorio di analisi a seconda del tipo di latte e del metodo di analisi applicato. Dette istruzioni debbono essere impartite di concerto con l'autorità nazionale competente.

Nelle istruzioni debbono figurare i seguenti punti:

- durante il trasporto e il deposito debbono essere prese opportune misure per evitare l'esposizione ad odori sgradevoli o alla luce solare diretta. I contenitori dei campioni, se trasparenti, devono essere conservati al buio.
- i campioni di latte crudo destinati all'analisi microbiologica devono essere trasportati e conservati ad una temperatura compresa fra 0° e 4°C. Il periodo che intercorre tra il campionamento e l'analisi deve essere il più breve possibile e in ogni caso non superiore alle 36 ore. L'autorità competente puó accettare una temperatura di deposito compresa fra 0° e 6°C se il periodo che intercorre tra il campionamento e l'analisi non è superiore alle 24 ore.
- i campioni di latte pastorizzato destinati all'analisi microbiologica debbono essere trasportati e conservati ad una temperatura compresa fra 0° e 4°C. Il tempo che intercorre fra il campionamento e l'analisi deve essere il più breve possibile ed in ogni caso non superiore alle 24 ore.
- i campioni di latte diversi dal latte crudo e dal latte pastorizzato destinati all'analisi microbiologica debbono essere conservati in laboratorio in condizioni di refrigerazione e il tempo che intercorre fra il campionamento e l'analisi deve essere il più breve possibile.

Le precauzioni speciali da prendere per alcune analisi vengono indicate nella descrizione dei diversi metodi utilizzabili.

ALLEGATO 2

I. DETERMINAZIONE DEL PUNTO DI CONGELAMENTO

1. OGGETTO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Il presente procedimento fissa il metodo ufficiale per la determinazione del punto di congelamento del latte intero crudo, pastorizzato, uperizzato e sterilizzato, del latte parzialmente scremato e del latte scremato mediante una apparecchiatura (il crioscopio a termistori) in cui il bagno controllato termostaticamente è raffreddato per refrigerazione elettrica e il termometro a mercurio viene sostituito da una sonda a termistore.
Esistono due tipi di strumenti: uno consente di ottenere il punto di congelamento massimo in corrispondenza del "plateau" della curva di congelamento, mentre l'altro, per motivi commerciali è regolato, in modo da effettuare la lettura ad un dato istante dopo l'inizio del congelamento. Poiché le curve di congelamento possono differire da un latte a un altro e tra il latte e le soluzioni standard usate per la taratura, questo metodo ufficiale richiede l'uso di strumenti di ricerca del plateau. Nel caso di misure di routine per lo screening del latte possono essere usati strumenti per la lettura a un tempo prefissato.
Il punto di congelamento puó servire a valutare la percentuale di acqua addizionata nel latte, purchè l'acidità del campione non sia superiore a 0,18 g di acido lattico per 100 ml (cfr. 7.4).

2. DEFINIZIONE

Si definisce punto di congelamento del latte il valore espresso in gradi Celsius (° C) ottenuto effettuando la misurazione secondo il procedimento descritto.

3. PRINCIPIO

Si raffredda un'aliquota di analisi del latte ad una determinata temperatura, dipendente dallo strumento, e si innesca la cristallizzazione per vibrazione meccanica provocando cosi' un rapido aumento di temperatura fino al plateau che corrisponde al punto di congelamento del campione.

Lo strumento viene tarato regolandolo in modo da ottenere delle letture esatte per due soluzioni standard, usando lo stesso procedimento seguito per i campioni di latte. In tali condizioni il plateau dà il punto di congelamento del latte in gradi Celsius.

4. APPARECCHIATURA E VETRERIA

Attrezzatura di uso corrente in laboratorio e segnatamente :

4.1. Crioscopio

Il crioscopio è costituito da un bagno frigorifero termostato, da una sonda a termistore (un termometro a resistenza a semiconduttore) con relativo circuito e un galvanometro o "lettore", da un agitatore del campione, da un dispositivo per innescare il congelamento e dalle provette contenenti il campione.

4.1.1. Bagno frigorifero

Possono essere usati due tipi di bagno frigorifero.

4.1.1.1. Tipo a immersione: è costituito da un bagno ben isolato contenente un liquido di raffreddamento appropriato che viene agitato in modo che la differenza di temperatura tra due punti qualsiasi del liquido non superi 0,2°C. La temperatura del liquido non deve variare di ± 0,5°C, rispetto al valore nominale dichiarato dal fabbricante.
E' importante che il liquido del bagno sia mantenuto ad un livello costante. Tutta la superficie della provetta al di sotto della tacca di taratura del volume deve essere coperta dal liquido di raffreddamento.

4.1.1.2. Tipo a circolazione. Un flusso continuo di un opportuno liquido refrigerante circola intorno alla provetta. Le fluttuazioni della temperatura del liquido intorno al valore nominale fissato dal fabbricante non devono superare gli ± 0,5°C.
Un liquido refrigerante adatto puó essere costituito da una soluzione acquosa al 33% (v/v) di 1,2 - etandiolo (glicol etilenico).

4.1.2. Termistore e circuito relativo

Il termistore deve essere del tipo a sonda di vetro, con diametro massimo di 1,80 ± 0,2 mm e con un diametro della biglia non superiore a 0,31 mm. La costante di tempo del temistore deve essere inferiore a 2 secondi e il valore di ß (cfr. nota) deve essere elevato. La tensione di lavoro, la corrente e la costante di dissipazione devono essere tali che quando la temperatura della zona circostante è - 0,512°C la temperatura del termistore non deve superarla di oltre 0,0005° C. La tolleranza massima per la resistenza deve essere di ± 5%.

Quando la sonda è in posizione di lavoro nel crioscopio, l'estremità della parte in vetro deve trovarsi sull'asse della provetta e a 44,6 ± 0,1 mm sotto l'estremità superiore del tubo (cfr. fig. 1). Occorre quindi disporre di una sagoma che consenta all'utilizzatore di posizionare la sonda correttamente.

Note - ß definisce le caratteristiche resistenza/temperatura del termistore in base alla formula :

$$-\frac{dR}{dT} x \frac{1}{R} = \frac{ß}{T2}$$

dove

T è la temperatura in °K

R è la resistenza in ohm alla temperatura T

$-\frac{dR}{dT} x \frac{1}{R} = \frac{ß}{T2}$ è il coefficiente di temperatura.

ß è una costante che dipende dal materiale di costruzione del termistore. Di solito si raccomanda un valore di ß superiore a 3.000.

4.1.3. Misurazione e apparecchio di lettura

4.1.3.1. Principio di misurazione. L'apparecchio usato deve operare secondo il principio della ricerca del primo "plateau" della curva del punto di

congelamento. Per plateau si intende la parte della curva in cui la temperatura rimane costante a ± 0,002°C per almeno 20 secondi.

4.1.3.2. Funzionamento manuale. La resistenza del termistore deve essere equilibrata per mezzo di un ponte di Wheatstone o di un dispositivo analogo, utilizzando dei resistori stabili di qualità superiore con tolleranza massima di ± 10 % ed il cui coefficiente di temperatura non superi 2 x 10^{-5} °C.

La variabilità della resistenza in tutto il campo di lavoro non deve discostarsi dalla linearità più dello 0,3% del suo valore massimo.

Deve essere possibile regolare i resistori per la taratura.

L'intervallo di graduazione della scala di lettura non deve essere superiore a 0,001°C.

4.1.3.3. Funzionamento automatico. Il dispositivo di lettura deve essere tale da poter apprezzare almeno 0,001°C nell'intervallo da 0 a -1°C.

Il dispositivo di lettura ed il relativo circuito devono avere una stabilità tale che indicazioni successive della stessa temperatura non varino di oltre 0,001°C.

La linearità del circuito deve essere tale che, se lo strumento à correttamente usato, non si producano errori superiori a ± 0,0001°C in nessun punto dell'intervallo compreso tra 0,400 e -0,600°C.

4.1.4. Agitatore

Per agitare l'aliquota di analisi si usa un filo metallico inerte rispetto al latte del diametro di 1 - 1,5 mm.

L'agitatore deve essere regolato in ampiezza e deve essere posizionato verticalmente con la sua estremità inferiore allo stesso livello della punta della sonda a termistore. E' consentita una tolleranza di circa 1,5 mm rispetto a tale posizione.

L'agitatore deve vibrare lateralmente con un'ampiezza sufficiente fissata dal fabbricante (non inferiore a ± 1,5 mm) per assicurare che

la temperatura nellaliquota di analisi si mantenga uniforme per tutta la determinazione. Durante il funzionamento l'agitatore non deve mai venire a contatto con la sonda a termistore o con le pareti della provetta.

4.1.5. Apparecchiatura per innescare il congelamento

Si puó ricorrere a qualsiasi apparecchiatura che funzionando inneschi istantaneamente il congelamento dell'aliquota di analisi in modo da portarne la temperatura in prossimità del punto di congelamento. A tale scopo puó essere usato l'agitatore; un metodo consiste nell'aumentare l'ampiezza delle vibrazioni per 1 - 2 secondi in modo che l'agitatore tocchi la parete della provetta.

4.1.6. Provette contenenti il campione

Le provette per il campione (cfr. fig. 1) devono essere di vetro di 50,8 ± 0,1 mm con un diametro esterno di 16,0 ± 0,1 mm e un diametro interno di 13,5 ± 0,1 mm. Nella provetta lo spessore della parete non deve variare di oltre 0,1 mm.

La provette devono recare una tacca di taratura a 29,8 mm sotto il bordo (21 mm sopra la base) in corrispondenza di un volume del campione di 2,5 ± 0,1 ml.

4.1.7. Alimentazione elettrica

La tensione di alimentazione deve essere stabilizzata sia all'interno dell'apparecchio, sia esternamente in modo che le fluttuazioni non superino il ± 1 % del valore nominale quando l'alimentazione principale varia del ± 6 %.

4.2. Bilancia analitica

4.3. Palloni tarati da 1.000 ml, classe A.

4.4. Stufe ad essicazione, ben ventilate, termostatabili ad una temperatura di 130 ± 1°C

oppure

forno elettrico, ventilato, termostatabile a una temperatura di 300 ± 25°C.

4.5. Essiccatore

5. REATTIVI

5.1. Acqua distillata in un apparecchio di vetro al borosilicato, bollita e raffreddata a 20 ± 2°C in un pallone provvisto di un tubo per l'assorbimento del biossido di carbonio.

5.2. Cloruro di sodio, di qualità analitica, finemente polverizzato, essiccato per 5 ore in un forno a 300 ± 25° C oppure in alternativa in una stufa a 130 ± 1°C per almeno 24 ore e raffreddato a temperatura ambiente in un essiccatore efficace.

5.3. Preparazione delle soluzioni standard

Pesare la quantità opportuna (cfr. tabella 1) di cloruro di sodio essiccato (5.2.) in un pesafiltri. Sciogliere in acqua distillata (5.1.), trasferire quantitativamente in un pallone tarato da 1.000 ml e portare a volume con acqua a 20 ± 2°C.

Conservare per non più di 2 mesi a circa 5°C in bottiglie di polietilene ben tappate di capacità non superiore a 250 ml.

Tabella 1 - Punto di congelamento delle soluzioni di cloruro di sodio a 20°C

g NaCl/l	°C
6,859	- 0,408
7,818	- 0,464
8,149	- 0,483
8,314	- 0,492
8,480	- 0,502
8,646	- 0,512
8,811	- 0,521
8,977	- 0,531
9,143	- 0,541
10,155	- 0,600

Prima di usare una soluzione standard, capovolgere dolcemente e ruotare più volte la bottiglia per mescolarne completamente il contenuto. Non agitare energicamente la soluzione standard per evitare che venga inglobata dell'aria.

I campioni di una soluzione standard devono essere prelevati dalla bottiglia versando la soluzione in un bicchiere pulito e asciutto. Non utilizzare pipette.

Non usare soluzioni contenute in flaconi vuoti per più di tre quarti né soluzioni aventi più di due mesi, se non sono conservate con un fungicida (ad esempio una soluzione di tiomersale a 10 g/l).

6. TARATURA DEL CRIOSCOPIO A TERMISTORE

Il crioscopio deve essere posizionato in modo tale che la temperatura dell'aria circostante non si discosti di oltre 1°C dalla temperatura di taratura. Il crioscopio non deve essere esposto alla luce solare o a correnti d'aria e la temperatura ambiente non deve superare i 26-27°C.
Verificare che il crioscopio sia in buono stato di funzionamento, conformente alle indicazioni del fabbricante e che sia stato azionato da almeno 12 ore prima di procedere alla taratura. Verificare la posizione della sonda, l'ampiezza di vibrazione dell'agitatore e la temperatura dei liquidi refrigeranti.

Scegliere due soluzioni standard (cfr. tabella 1) che delimitino da vicino il valore presunto del punto di congelamento dei campioni di latte da analizzare. E' preferibile che la differenza dei punti di congelamento delle due soluzioni non sia inferiore a - 0,100°C.

(In alcuni tipi diffusi di crioscopio il circuito del termistore è tale da raggiungere l'equilibrio per un determinato valore del punto di congelamento all'interno del campo di misurazione dello strumento. In tali casi l'impiego fra le altre soluzioni di taratura di una soluzione standard avente tale punto di congelamento rende più facili le operazioni di taratura; il fabbricante deve fornire tale valore).

Pipettare 2,5 ± 0,1 ml di una soluzione standard in una provetta per campioni pulita e asciutta e fare funzionare il crioscopio.

Note - Le provette per i campioni usate durante la taratura devono essere dello stesso tipo di vetro di quelle usate durante l'analisi dei campioni di latte e devono essere lavate e sciacquate contemporaneamente ad esse con acqua demineralizzata.
Le temperature delle soluzioni standard devono essere uguali a quelle dei campioni di latte.

Procedere ai controlli di taratura, seguendo le istruzioni del fabbricante, fino a quando la lettura del crioscopio coincide con il punto di congelamento della soluzione standard. Ripetere il procedimento con l'altra soluzione standard, e continuare ad alternarle in questo modo fino a quanto due letture successive danno per ciascuna soluzione il corretto valore del rispettivo punto di congelamento senza ulteriori aggiustamenti. Il crioscopio è cosi' pronto per l'impiego ed indicherà direttamente, senza alcuna correzione, il punto di congelamento del campione di latte.

7. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE PER L'ANALISI

7.1. Se occorre,conservare i campioni ad una temperatura compresa tra 0 e 5°C.

7.2. Eliminare dal campione i corpi estranei visibili ad occhio nudo o le particelle di materia grassa solida, filtrando eventualmente in un recipiente asciutto e pulito, e mescolare dolcemente il campione. L'eventuale filtro deve essere inerte rispetto al latte e risultare efficiente alla temperatura di laboratorio.

7.3. Il latte puó essere analizzato alla temperatura di conservazione (tra 0 e 5°C) oppure puó essere portato alla temperatura di laboratorio prima di iniziare l'analisi. In ogni caso la soluzione standard ed i campioni di latte al momento della loro utilizzazione devono essere alla stessa temperatura.

7.4. Determinare l'acidità titolabile del latte per quanto possibile contemporaneamente alla determinazione del punto di congelamento. Non si possono analizzare campioni con acidità superiore a 0,18 g di acido lattico per 100 ml di latte.

7.5. Prima dell'analisi il latte UHT e quello sterilizzato devono riposare in recipiente aperto per almeno 20 minuti.

8. PROCEDIMENTO

8.1. Verifiche preliminari

Verificare che il livello e la temperatura del liquido refrigerante sia quello previsto dalle istruzioni del fabbricante e che, se occorre, la sonda a termistore sia collocata in una provetta vuota nell'alloggiamento destinato al campione. Mettere in funzione il crioscopio ed accertare che il liquido refrigerante secondo il caso sia adeguatamente agitato o circoli correttamente. Dopo almeno 12 ore di funzionamento, verificare la temperatura del liquido refrigerante nonché la posizione e l'ampiezza di vibrazione dell'agitatore.

8.2. Verifica di routine della taratura

Prima di ciascuna serie di determinazioni, misurare il punto di congelamento di una soluzione standard di cloruro di sodio (ad es.: una soluzione con punto di congelamento -0,512°C) fino a quando la differenza fra due determinazioni consecutive non sia maggiore di 0,001°C. Se la media di questi due valori differisce dal punto di congelamento della soluzione standard di più di 0,002°C, effettuare nuovamente la taratura del crioscopio come descritto al paragrafo 6.

Se il crioscopio viene utilizzato in continuo, effettuare la verifica di routine della taratura almeno ogni ora, tenendo conto anche delle istruzioni del fabbricante.

8.3. Determinazione del punto di congelamento del latte

Capovolgere dolcemente e far ruotare più volte il recipiente con il campione di latte in modo da mescolarne il contenuto. Evitare comunque di agitare violentemente il campione per non fare inglobare aria.

Pipettare 2,5 e ± 0,1 ml di latte in una provetta pulita e asciutta prelevando l'eventuale quantità in eccesso con una pipetta. Verificare che la sonda e l'agitatore siano puliti ed asciutti strofinandoli, se occorre, attentamente dal basso verso l'alto con una salviettina morbida, pulita e che non lasci peli.

Inserire la provetta nel crioscopio tarato seguendo le istruzioni del fabbricante. Il latte deve essere raffreddato e il congelamento deve innestarsi alla temperatura specificata dal fabbricante con una tolleranza di ± 0,1°C.

(Su alcuni strumenti automatici questa temperatura puó essere rilevata con un lettore digitale; negli strumenti manuali la precisione richiesta si ottiene verificando che il congelamento inizi quando l'ago o il filo del galvanometro coincide con la tacca specifica).

Se per qualche motivo il congelamento è iniziato prima o dopo il livello di remperatura indicata, interrompere l'analisi e ricominciarla con un'altra aliquota di analisi del latte. Se anche questa seconda aliquota congela prima della temperatura indicata, riscaldare a 45°C un'ulteriore aliquota di analisi e mantenerla per cinque minuti a questa temperatura per far fondere la materia grassa cristallina.

Raffreddare quindi alla temperatura della prova e procedere immediatamente al nuovo saggio. La temperatura del latte dopo l'innesco del congelamento aumenta rapidamente sino ad un valore che si mantiene praticamente costante per un certo periodo prima di abbassarsi nuovamente. Il punto di congelamento corrisponde alla temperatura più elevata raggiunta durante tale periodo ed è questo il valore da registrare.

Nota - Il periodo in cui la temperatura si mantiene costante e l'intervallo di tempo che intercorre tra l'innesco del congelamento e l'istante in cui si raggiunge la temperatura più elevata variano da un campione all'altro e per l'acqua e le soluzioni standard di cloruro di sodio sono notevolmente più brevi che per il latte. E' essenziale annotare la temperatura più elevata.

Una volta effettuata la misura in modo soddisfacente, estrarre la provetta e lavare con acqua la sonda a termistore e l'agitatore asciugandoli dal basso verso l'alto con una salviettina morbida pulita e che non lasci peli; effettuare quindi una seconda determinazione su un'altra aliquota di analisi del latte.

Se la differenza fra i punti di congelamento ottenuti è maggiore del valore di riperibilità (0,004°C) eseguire una seconda determinazione su un'altra aliquota. Purchè le due determinazioni non differiscano di più di 0,004°C registrare i valori ottenuti e utilizzarli per calcolare il risultato definitivo.

8.4. Raffreddamento della sonda

Dopo aver utilizzato l'apparecchio, collocare una provetta vuota nell'alloggiamento destinato al campione ed abbassare il mandrino in modo da mantenere la sonda fredda.

(Nei tipi di crioscopio in cui ció non sia possibile prima di procedere alle misurazioni è indispensabile accertare che la sonda sia adeguatamente raffreddata effettuando, ad esempio, alcune determinazioni fittizie fino ad ottenere delle letture costanti).

9. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

9.1. Calcolo

Se la verifica di routine della taratura conferma la validità di quest'ultima, calcolare la media dei valori accettabili del punto di congelamento ottenuti con determinazioni effettuate in doppio, approssimata a meno della terza cifra decimale.
Se la somma dei due valori accettabili ottenuti con determinazioni effettuate in doppio è un numero dispari, la media dev'essere arrotondata al numero pari più vicino come mostra l'esempio seguente :

Punto di congelamento (°C)

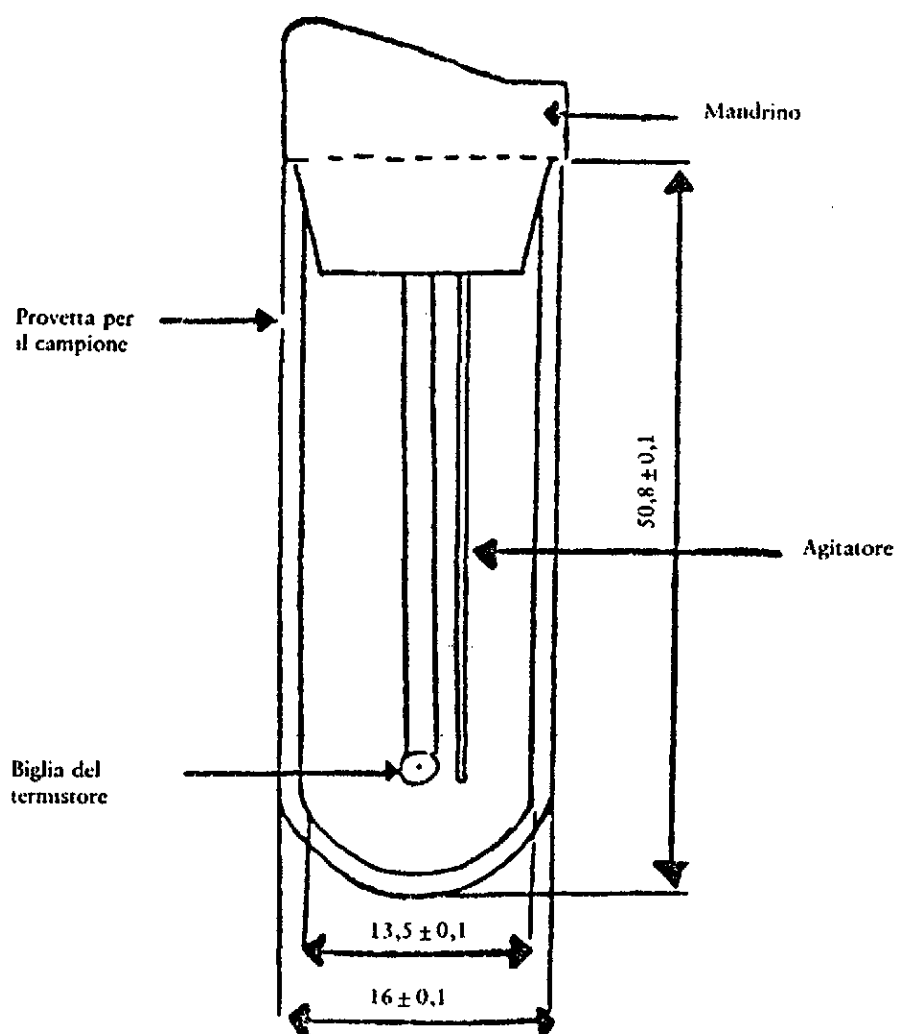
Valori delle determinazioni in doppio		Media
- 0,544	- 0,545	- 0,544
- 0,545	- 0,546	- 0,546

9.2. Precisione

9.2.1. Ripetibilità (r) : 0,002°C.

9.2.2. Riproducibilità (R) : 0,006°C.

Figura 1

Particolare del crioscopio a termistore 4.1. (posizione della provetta rispetto alla biglia del termistore e all'agitatore)

Tutte le dimensioni in mm

II. DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITA' FOSFATASICA

1. OGGETTO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Il presente procedimento descrive il metodo di riferimento per la determinazione dell'attività fosfatasica nel latte pastorizzato.

2. DEFINIZIONE

2.1. L'attività fosfatasica è una misura della quantità di fosfatasi alcalina attiva presente nel prodotto ed espressa come quantità di fenolo, in mocrogrammi, liberata da 1 ml di latte pastorizzato nelle condizioni specificate nel metodo.

2.2. L'attività fosfatasica di un latte si considera negativa se risulta inferiore a 4 ug/ml.

3. PRINCIPIO

L'attività fosfatasica è determinata dalla quantità di fenolo liberata dal fenilfosfato disodico addizionato al campione. Il fenolo liberato reagisce con dibromochinoneclorimide dando dibromoindofenolo (di colore azzurrognolo) che viene determinato per colorimetria a 610 nm. Si effettua quindi un confronto con un campione in cui l'enzima fosfatasi è stato precedentemente distrutto.

4. REATTIVI

4.1. Tampone di borato e di idrossido di bario

4.1.1. Sciogliere in acqua 50,0 g di idrossido di bario ($Ba(OH)_2.8H_2O$) e portare a 1.000 ml.

4.1.2. Sciogliere in acqua 22,0 g di acido borico (H_3BO_3) e portare a 1.000 ml.

4.1.3. Scaldare 500 ml di ciascuna soluzione a 50°C, mescolare le soluzioni, agitare, raffreddare rapidamente a circa 20°C e regolare eventualmente il pH a 10,6 ± 0,1 con la soluzione 4.1.1. o con la 4.1.2. Filtrare. Conservare la soluzione in un recipiente ermeticamente chiuso.

4.1.4. Prima dell'uso, diluire la soluzione con uguale volume di acqua.

4.2. Tampone per lo sviluppo del colore

Sciogliere in acqua 6,0 g di metaborato sodico ($NaBO_2$) oppure 12,6 g di $NaBO_2.4H_2O$ e 20,0 g di cloruro di sodio (NaCl) e portare a 1.000 ml.

4.3. Tampone del colore diluito

Sciogliere con acqua 10 ml del tampone per lo sviluppo del colore (4.2.) portando il volume a 100 ml.

4.4. Substrato tamponato

Sciogliere 0,1 g di fenilfosfato disodico disidratato esente da fenolo in 100 ml di tampone (4.1.3.) oppure sciogliere 0,5 g di fenilfosfato disodico in 4,5 ml di soluzione tampone per lo sviluppo del colore (4.2.). Aggiungere due gocce di soluzione BQC (4.6.) e lasciare in riposo a temperatura ambiente per trenta minuti. Estrarre il colore cosi' formatosi con 2,5 ml di butan-1-olo. Lasciar riposare fino alla separazione del botan-1-olo. Togliere il butan-1-olo e eliminarlo. Dopo la separazione scartare il butan-1-olo. Ripetere, se necessario, l'estrazione.

La soluzione puó essere conservata in frigorifero per quanche giorno; prima dell'uso sviluppare il colore ed estrarre di nuovo. Preparare il substrato tamponato subito prima dell'uso diluendo 1 ml di questa soluzione a 100 ml con la soluzione tampone di borato e di idrossido di bario (4.1.3.).

4.5. Precipitante al rame-zinco

Sciogliere in acqua 3,0 g di solfato di zinco ($ZnSO_4$. $7H_2O$) e 0,6 g di solfato rameico ($CuSO_4$. $5H_2O$) e portare a 100 ml.

4.6. Soluzione 2,6-dibromochinoneclorimide (soluzione BQC)

Sciogliere 40 ± 1 mg di 2,6-dibromochinoneclorimide (BQC) ($C_6H_2Br_2CNO_6$) in 10 ml di etanolo al 96% (v/v).

Conservare in frigorifero in bottiglia di colore scuro. Il reattivo va buttato via se cambia colore o se è stato preparato da più di un mese.

4.7. Soluzione di solfato rameico (II)

Sciogliere in acqua 0,05 g di solfato rameico (II) ($CuSO_4.5H_2O$) e portare a 100 ml.

4.8. Soluzioni standard di fenolo

4.8.1. Pesare 200 ± 2 mg di fenolo puro anidro, e portare con acqua a 100 ml in un pallone tarato mescolando. Questa soluzione madre puó essere conservata per diversi mesi in frigorifero.

4.8.2. Diluire 10 ml della soluzione madre a 100 ml con acqua e mescolare. 1 ml contiene 200 ug di fenolo.

5. APPARECCHIATURA E VETRERIA

Note : a) Tutta la vetreria, i tappi e gli attrezzi per il campionamento devono essere accuratamente puliti. E' consigliabile risciacquarli con acqua distillata bollita di recente o passarli a vapore.

b) Alcuni tipi di tappi di plastica possono cedere fenolo e non devono quindi essere usati.

Attrezzatura di uso corrente in laboratorio ed in particolare :

5.1. Bilancia analitica

5.2. Bagnomaria, termostatabile a 37 ± 1°C.

5.3. Spettrofotometro, per letture ad una lunghezza d'onda di 610 nm.

5.4. Provette per la prova, da 16 o 18 mm x 150 mm, preferibilmente graduate sui 5 e 10 ml.

5.5. Pipette

5.6. Imbuti di vetro di dimensioni appropriate, ad esempio con diametro di 5 cm.

5.7. Filtri pieghettati con diametro di almeno 9 cm per velocità di filtrazione media.

5.8. Palloni tarati per la preparazione delle soluzioni standard.

6. PROCEDIMENTO

Note -

a) Evitare, nel corso della determinazione, l'esposizione diretta alla luce solare.

b) Devono essere evitate tracce di saliva o di sudore che possono dare risultati falsamente positivi. Prendere di conseguenza le necessarie precauzioni nel pipettare il campione.

6.1. Preparazione del campione da analizzare

6.1.1. Effettuare l'analisi subito dopo il campionamento. In caso contrario conservare il campione in frigorifero, ma per non più di 2 giorni.

6.2. Aliquota di analisi

Pipettare in ciascuna delle due provette per la prova (5.4.) 1 ml del campione da analizzare, usando una provetta come controllo o per la prova in bianco.

6.3. Determinazione

6.3.1. Scaldare il bianco per 2 minuti in acqua bollente; coprire la provetta e il becher contenente l'acqua bollente con un foglio di alluminio, per essere certi che tutta la provetta venga scaldata. Raffreddare rapidamente fino a temperatura ambiente.

6.3.2. A partire da questo momento trattare il bianco ed il campione in esame nello stesso modo. Aggiungere 10 ml di substrato tamponato (4.4.) e mescolare.

6.3.3. Porre subito in incubazione i campioni nel bagnomaria (5.2.) per 60 minuti, mescolando di tanto in tanto (almeno 4 volte) il contenuto della provetta.

6.3.4. Scaldare in acqua bollente per 2 minuti come descritto al precedente punto 6.3.1. Raffreddare quindi rapidamente fino alla temperatura ambiente.

6.3.5. Aggiungere 1 ml del precipitante rame-zinco (4.5.) a ciascuna provetta e mescolare accuratamente.

6.3.6. Filtrare su carta da filtro asciutta, scartare i primi 2 ml e, se necessario, filtrare di nuovo sino ad ottenere un filtrato limpido; raccogliere 5 ml di filtrato in una provetta.

6.3.7. Aggiungere 5 ml del tampone per lo sviluppo del colore (4.2.).

6.3.8. Addizionare 0,1 ml della soluzione BQC (4.6.), mescolare e lasciare sviluppare la colorazione per 30 minuti a temperatura ambiente.

6.3.9. Misurare l'assorbanza rispetto al controllo o al bianco nello spettrofotometro (5.3.) alla lunghezza d'onda di 610 nm.

6.3.10. Se l'assorbanza misurata in 6.3.9. è superiore a quella della soluzione standard, contenente 20 ug di fenolo per provetta, misurata al punto 6.4.4., ripetere la determinazione diluendo opportunamente il campione.

Preparare tale diluizione mescolando 1 volume del campione in esame con un appropriato volume di una aliquota dello stesso campione portata con precauzione all'ebollizione per inattivare la fosfatasi.

6.4. Preparazione della curva di taratura

6.4.1. A partire dalla soluzione standard di fenolo 4.8.2., preparare una serie appropriata di soluzioni standard diluite contenenti 0 (controllo o bianco), 2, 5, 10 e 20 ug di fenolo per millilitro e pipettare rispettivamente 1 ml di acqua e 1 ml delle quattro soluzioni standard di fenolo in ciascuna delle cinque provette.

6.4.2. Aggiungere a ciascuna provetta 1 ml della soluzione di solfato rameico (II) (4.7.), 5 ml del tampone del colore diluito (4.3.), 3 ml di acqua e 0,1 ml della soluzione BQC (4.6.); mescolare.

6.4.3. Lasciare sviluppare il colore per 30 minuti a temperatura ambiente.

6.4.4. Misurare l'assorbanza rispetto al controllo o al bianco nello spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 610 nm.

6.4.5. A partire dai valori di assorbanza (6.4.4.) ottenuti per ciascuna quantità di fenolo addizionata (6.4.1.), calcolare la retta di regressione con il metodo dei minimi quadrati.

7. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

7.1. Calcolo e formula

7.1.1. Partendo dalla lettura dell'assorbanza (6.3.9.) determinare la quantità di fenolo utilizzando la retta di regressione ottenuta (6.4.5.).

7.1.2. Calcolare l'attività fosfatasica, espressa in microgrammi di fenolo per millilitro di latte pastorizzato con la seguente formula :

Attività fosfatasica = 2,4 x A x D

dove

A è la quantità di fenolo in mocrogrammi ottenuta come indicato in 7.1.1.;

D è il fattore di diluizione della diluizione effettuata come indicato in 6.3.10. (in assenza di diluizione, D = 1).

Il fattore 2,4 è il fattore di diluizione (5/12 di 1 ml del campione in esame) - cfr. 6.2. ed ancora 6.3.2., 6.3.5. e 6.3.6.

7.2. Precisione

7.2.1. Ripetibilità (r) : 2 ug. fenolo/ml.

7.2.2. Riproducibilità (R) : 3 (iniziale) ug. fenolo/ml.

7.2.3. Se si è proceduto ad una diluizione come indicato in 6.3.10., le tolleranze di cui ai punti 7.2.1. e 7.2.2. si applicano ai risultati ottenuti sul campione diluito.

III. DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITA' PEROSSIDASICA

1. OGGETTO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Il presente procedimento descrive il metodo ufficiale per la determinazione della presenza o assenza dell'enzima perossidasico nel latte come controllo della pastorizzazione.

2. DEFINIZIONE

Reazione perossidasica positiva:

Se il latte è stato pastorizzato in modo corretto dopo aver mescolato comparirà entro 30 secondi una colorazione azzurra.

Reazione perossidasica negativa:

Nei 30 secondi che seguono la miscelazione, non appare alcuna colorazione.

3. PRINCIPIO

L'enzima perossidasico decompone il perossido di idrogeno. L'ossigeno atomico liberato ossida l'1.4-fenilenediammina che è incolore trasformandolo in indofenolo di colore rosso porpora (test di Storchs). L'intensità del colore è proporzionale alla concentrazione dell'enzima.

4. REATTIVI

4.1. Soluzione di 1,4-fenilenediammina

Sciogliere in acqua calda (50°C) 2 g di 1,4-fenilenediammina ($C_6H_8N_2$) e portare a 100 ml. Versare la soluzione in una bottiglia scura chiusa con un tappo di vetro e conservarla al fresco e al riparo dalla luce. Uno o due giorni dopo la preparazione una soluzione di 1,4-fenilenediammina forma un deposito e non è più utilizzabile.

4.2. Soluzione di perossido di idrogeno

Diluire con acqua 9 ml di perossido di idrogeno al 30% e portare a 100 ml. Per stabilizzare aggiungere 1 ml di acido solforico concentrato per litro di soluzione.

La soluzione di perossido di idrogeno è stabile per un mese se viene tenuta al fresco e al riparo dalla luce in una bottiglia con tappo di vetro evitando qualsiasi contatto con composti organici.

5. PROCEDIMENTO

5.1. Introdurre 5 ml del campione di latte in una provetta pulita munita di chiusura adeguata.

5.2. Aggiungere 5 ml della soluzione di 1,4-fenilenediammina (4.1).

5.3. Aggiungere 2 gocce di soluzione di perossido di idrogeno (4.2.).

5.4. Controllare la colorazione nei 30 secondi che seguono la miscelazione. Se la colorazione azzurra si ottiene più di 30 secondi dopo l'addizione dei reagenti la reazione non è specifica.

IV. NUMERAZIONE DEI MICROORGANISMI - CONTEGGIO IN PIASTRA A 30°C.

1. OGGETTO E CAMPO D'APPLICAZIONE

Il presente procedimento descrive il metodo ufficiale per la numerazione dei microrganismi con la tecnica del conteggio delle colonie a 30°C.
Il metodo si applica al latte crudo, al latte pastorizzato, nonché al latte uperizzato e sterilizzato dopo preincubazione a 30°C per 15 gg.

2. DEFINIZIONE

Con il termine "microorganismi" si intendono gli organismi che formano colonie numerabili se posti in incubazione aerobica nelle condizioni di seguito specificate.

3. PRINCIPIO

In alcune piastre di Petri si mescola un volume definito del campione di latte con il terreno colturale incubando a 30°C per 72 ore. Si contano quindi le colonie e si calcola il numero di microrganismi per 1 ml nel caso del latte crudo o pastorizzato e per 0,1 ml nel caso del latte uperizzato o sterilizzato preincubato.

4. APPARECCHIATURA E VETRERIA

Attrezzatura di uso corrente in laboratorio e in particolare :

4.1. Apparecchiatura

4.1.1. Stufa ad aria calda, in grado di operare a 170-175°C.

4.1.2. Autoclave, termostatabile a 121 ± 1 °C.

4.1.3. Termostato, regolabile ad una temperatura uniforme di 30 ± 1°C.

4.1.4. pHmetro, con compensazione della temperatura e con una precisione di ± 0,1 unità pH.

4.1.5. Bagnomaria, regolabile a 45 ± 1°C

4.1.6. Lente, ingrandimento 2-4x.

4.1.7. Lente, ingrandimento 8-10x.

4.1.8. Apparecchio contacolonie

4.1.9. Mescolatore in grado di mescolare 1 ml del campione di latte o della diluizione decimale con 9 ml del diluente e il cui funzionamento sia basato sul principio della rotazione eccentrica del contenuto della provetta.

4.2. Vetreria

4.2.1. Provette con chiusura opportuna e di capacità sufficiente a contenere 10 ml della prima diluizione o delle diluizioni decimali successive lasciando lo spazio necessario per la miscelazione.

4.2.2. Palloni da 150 - 250 ml o provette, da circa 20 ml, per contenere il terreno colturale.

4.2.3. Pipette sterili (chiuse ad una estremità con un batuffolo di cotone) in vetro o materiale sintetico con punta a foro normale, della capacità nominale di 1 ml, aventi un foro di scorrimento del diametro di 1, 75 - 3 mm.

4.2.4. Piastre di Petri sterili, in vetro trasparente e incolore o materiale sintetico sterile, con diametro interno del fondo della scatola di circa 90-100 mm. L'altezza interna deve essere di almeno 10 mm. Il fondo non deve presentare alcuna irregolarità che possa interferire con il conteggio delle colonie.

4.2.5. **Sterilizzazione della vetreria**

La vetreria deve essere sterilizzata con uno dei seguenti metodi :

a) mantenendola a 170 - 175°C in una stufa ad aria calda (4.1.1.) per almeno un'ora.

b) mantenendola a 121 ± 1°C in autoclave (4.1.2.) per almeno 20 minuti.

Fare particolare attenzione a che nell'autoclave si abbia un'adeguata penetrazione del vapore - ad esempio se l'attrezzatura è sterilizzata in contenitori questi non devono essere chiusi ermeticamente e i tappi dei palloni non devono essere serrati.

La vetreria sterilizzata nell'autoclave deve essere asciugata facendo scaricare il vapore.

Le pipette devono essere sterilizzate in una stufa ad aria calda (4.1.1.).

5. TERRENO COLTURALE - LATTE AGARIZZATO PER IL CONTEGGIO IN PIASTRA

5.1. Composizione

Estratto di lievito	2,5 g
Triptone	5,0 g
Glucosio D(+) o destrosio	1,0 g
Latte scremato in polvere	1,0 g
Agar	da 10 a 15 g a seconda delle proprietà gelatinizzanti dell'agar impiegato
Acqua	100 ml

Il latte scremato in polvere deve essere esente da sostanze inibenti. Ció deve essere verificato con delle prove comparative utilizzando un latte scremato in polvere che sia riconosciuto esente da sostanze inibenti.

Preparazione

Disperdere e sciogliere gli ingredienti in acqua nel seguente ordine: estratto di lievito, triptone, glucosio ed infine latte scremato in polvere. Questa operazione risulterà più facile riscaldando la sospensione. Aggiungere l'agar e portare ad ebollizione, agitando in continuazione sino a quando l'agar è completamente disciolto oppure riscaldare a vapore per circa 30 minuti.

Filtrare evenutalmente su carta da filtro.

Verificare il pH con un pHmetro (4.1.4.) ed aggiustarlo eventualmente con una soluzione (almeno 0,1 mol/l) di idrossido di sodio o di acido cloridrico in modo che, dopo sterilizzazione, il pH a 25°C sia 6,9 ± 0,1.

5.2. Distribuzione, sterilizzazione e conservazione del terreno di coltura.

Suddividere il terreno (5.1.) in quantità di 100 - 150 ml per pallone o di 12 - 15 ml per provetta (4.2.2.). Tappare i palloni e le provette.

Sterilizzare in autoclave (4.1.2.) a 121 ± 1°C per 15 minuti.

Controllare il pH del terreno.

Se il terreno non deve essere usato immediatamente, conservarlo al riparo dalla luce a una temperatura compresa tra 1 e 5°C per non più di un mese dopo la preparazione.

5.3. Terreno colturale disidratato disponibile in commercio

Il terreno di coltura (5.1.) puó essere preparato a partire da un terreno disidratato disponibile in commercio. Seguire in tal caso le istruzioni del fabbricante aggiungendo, prima della dissoluzione, il latte scremato in polvere, nel caso che questo non sia indicato fra gli ingredienti.

Aggiustare il pH a 6,9 ± 0,1 a 25°C come descritto al punto 5.1. e ripartire nei contenitori, sterilizzare e conservare il terreno come descritto al punto 5.2.

6. DILUENTI

6.1. Soluzione salina/peptone

Composizione

Peptone	1,0 g
Cloruro di sodio (NaCl)	8,5 g
Acqua	1.000 ml

Preparazione

Sciogliere gli ingredienti in acqua, riscaldando, se necessario.

Verificare il pH con un pHmetro (4.1.4.) e aggiustare evenutalmente il pH con una soluzione (almeno 0,1 mol/l) di idrossido di sodio o di acido cloridrico in modo che, dopo sterilizzazione, il pH a 25°C risulti 7,0 ± 0,1.

6.2. Distribuzione, sterilizzazione e conservazione del diluente

Distribuire il diluente (6.1.) nelle provette (4.2.1.) in quantità tali che a sterilizzazione avvenuta ciascuna provetta ne contenga 9,0 ml. ± 0,2. Tappare le provette.

Sterilizzare in autoclave (4.1.2.) a 121 ± 1°C per 15 minuti.

Verificare il pH del diluente.

Se non deve essere usato immediatamente, conservare il diluente, al riparo della luce, a una temperatura compresa tra 1 e 5°C, per non più di un mese dopo la preparazione.

6.3. Diluenti disidratati disponibili in commercio

Il diluente (6.1.) puó essere preparato a partire da compresse o polveri disidratate disponibili in commercio. Seguire in tal caso le istruzioni del fabbricante. Aggiustare il pH come descritto al punto 6.1. e distribuire, sterilizzare e conservare i diluenti come descritto in 6.2.

7. PROCEDIMENTO

7.1. Fusione del terreno nutritivo

Prima di procedere all'esame microbiologico, far fondere rapidamente la quantità di terreno necessaria e raffreddare il terreno a 45 ± 1°C in bagnomaria (4.1.5).

7.2. Preparazione del campione di latte

Mescolare a fondo il campione di latte, in modo che i microrganismi siano distribuiti il più uniformemente possibile, capovolgendo rapidamente per 25 volte il contenitore del campione. Evitare la formazione di schiuma oppure lasciarla disperdere. Tra la miscelazione ed il prelievo dell'aliquota di analisi non devono trascorrere più di tre minuti.

7.3. Preparazione della prima diluizione (10^{-1}) (latte crudo e pastorizzato).

Aggiungere con una pipetta sterile (4.2.3.) 1 ml del campione del latte (7.2.) crudo o pastorizzato a 9 ml di diluente (6.1.) evitando di toccare il diluente con la pipetta. La temperatura del diluente deve essere approssimativamente uguale a quaella del campione di latte. Mescolare accuratamente questa prima diluizione nel mescolatore (4.1.9.) per 5-10 secondi.

Si ottiene cosi' una prima diluizione $10-^{1}$.

7.4. Preparazione delle diluizioni decimali successive (latte crudo e pastorizzato)

Trasferire con una pipetta sterile (4.2.3.), 1 ml della prima diluizione (7.3.) in 9 ml di diluente (6.1.), secondo le istruzioni del punto 7.3.

Si ottiene cosi' la diluizione 10^{-2}.

Ripetere queste operazioni per ottenere diluizioni decimali successive fino ad ottenere un numero adeguato di microrganismi (8.1.).

7.5. Semina delle piastre di Petri

7.5.1. Latte crudo: trasferire con una pipetta sterile (4.2.3.), 1 ml del campione e/o della diluizione decimale appropriata in una piastra

(4.2.4.). L'esame deve essere effettuato almeno su due diluizioni.Preparare una piastra per ciascuna delle diluizioni ritenute appropriate (8.1.1.).

7.5.2. Latte pastorizzato: trasferire con una pipetta sterile (4.2.3.), 1 ml del campione e/o della diluizione decimale appropriata in una piastra (4.2.4.). L'esame deve essere effettuato almeno su due diluizioni. Per ciascuna diluizione ritenuta appropriata (8.1.1.) preparare due piastre.

7.5.3. Latte UHT e sterilizzato (analizzato dopo 15 giorni di preincubazione a 30°C - Allegato A, parte III del decreto ministeriale 14 maggio 1988, n. 212, pubblicato nel S.O. alla Gazzetta Ufficiale n. 142 del 18 giugno 1988, (5)) :

Trasferire con una pipetta sterile (4.2.3.), 0,1 ml del campione di latte (7.2.) in una piastra (4.2.4.). Preparare due piastre.

7.6. Distribuzione del terreno

Versare circa 15-18 ml del terreno (7.1.) in ciascuna delle piastre seminate. Mescolare immediatamente il terreno facendo ruotare la piastra di Petri in modo tale che dopo l'incubazione si ottenga una distribuzione uniforme delle colonie.

Il tempo che intercorre tra la fine della preparazione del campione e la miscelazione dell'aliquota di analisi o, a seconda del tipo di latte, della sua diluizione con il terreno non deve superare i 15 minuti.

Lasciare solidificare su una superficie orizzontale fredda e pulita.

7.7. Incubazione delle piastre di Petri

Mettere le piastre, capovolte, in un termostato (4.1.3.). Non impilarne più di sei alla volta. Le pile di piastre non devono toccarsi l'una con l'altra e non devono venire a contatto con le pareti o con la parte superiore del termostato.

Incubare a 30 ± 1°C per 72 ± 2 ore.

7.8. Conteggio delle colonie

Contare le colonie nelle piastre di Petri che contengono al massimo 300 colonie.

Esaminare le piastre con una luce attenuata. Per agevolare il conteggio si puó ricorrere a un'opportuna lente (4.1.6.) e/o a un apparecchio contacolonie (4.1.8.). Evitare di confondere le particelle di precipitato nelle piastre con le colonie puntiformi. In caso di dubbio esaminarle con attenzione usando eventualmente una lente d'ingrandimento più forte (4.1.7.), in modo da poter distinguere le colonie dalle sostanze estranee.

Le colonie invasive vanno considerate come singole colonie. Se queste ricoprono meno di un quarto della piastra, contare le colonie sulla restante parte e calcolare il numero corrispondente per l'intera piastra. Scartare invece la piastra se le colonie invasive ne ricoprono più di un quarto.

8. CALCOLO ED ESPRESSIONE DEI RISULTATI

8.1. Latte crudo e pastorizzato

8.1.1. Utilizzare i risultati relativi alle piastre contenenti da 10 a 300 colonie. (cfr. 8.1.3. e 8.1.4.).

8.1.2. Il numero di microrganismi in 1 ml di latte crudo o pastorizzato à dato dalla formula :

$$\frac{\sum c}{(n_1 + 0,1\ n_2)d}$$

dove

$\sum C$ è la somma del numero di colonie contate secondo 8.1.1.,

$(n_1 + 0,1\ n_2)d$ è uguale al volume di campione inoculato con :

n_1 è il numero di piastre utilizzate per la prima diluizione,

n_2 è il numero di piastre utilizzate per la seconda diluizione,

d è il fattore di diluizione relativo ai primi conteggi effettuati.

Il risultato ottenuto viene approssimato a due cifre significative. Se la cifra da arrotondare è un 5, effettuare l'approssimazione in modo che il numero immediatamente a sinistra sia un numero pari.

Esempio (latte pastorizzato)
diluizione 10^{-2} 278 e 290 colonie
10^{-3} 33 e 28 colonie

$$\text{numero/ml} = \frac{278+290+33+28}{(2+0,1x2)\ 10^{-2}}$$

$$= \frac{629}{0,022} = 28590 = 29000 = 2,9x10^{4}$$

8.1.3. Se tutti i calcoli danno meno di 10, indicare che il numero di microrganismi per millilitro è "inferiore a 10 x d per ml", dove "d" è il reciproco del fattore di diluizione più basso.

8.1.4. Se tutti i calcoli danno più di 300 colonie ma il conteggio è possibile, procedere ad una stima e moltiplicare tale valore per il reciproco del fattore di diluizione. Riportare il risultato come "numero stimato di microrganismi per ml".

8.2. LATTE UHT E STERILIZZATO

Conteggi in piastra di più di 10 colonie per 0,1 ml non soddisfano ai requisiti del decreto ministeriale 14 maggio 1988, n. 212, pubblicato nel S.O. alla Gazzetta Ufficiale n° 142 del 18 giugno 1988.

9. PRECISIONE

Non si dispone ancora di risultati di prove interlaboratorio riconosciute a livello internazionale.

V. NUMERAZIONE DEI MICRORGANISMI - CONTEGGIO IN PIASTRA A 21°C

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Il presente procedimento descrive il metodo ufficiale per la enumerazione dei microrganismi con la tecnica del conteggio delle colonie a 21°C, nel latte pastorizzato dopo incubazione dello stesso a 6°C per 5 giorni al fine di determinare il grado di contaminazione del latte pastorizzato con microrganismi psicrotrofi in grado di moltiplicarsi nel latte a 6°C.

2. DEFINIZIONE

Con il termine "microrganismi" si intendono gli organismi che se posti in incubazione aerobica nelle condizioni di seguito specificate formano colonie numerabili.

3. PRINCIPIO

Viene preincubato il latte pastorizzato a 6°C per 5 giorni. Si mescola quindi una aliquota definita del campione di latte con il terreno di coltura in alcune piastre di Petri che vengono incubate a 21°C per 25 ore. Si contano quindi le colonie e si calcola il numero di microrganismi per 1 ml di latte pastorizzato.

4. APPARECCHIATURA E VETRERIA

Materiale di uso comune in laboratorio e in particolare

4.1. Apparecchiatura

4.1.1. Stufa ad aria calda, in grado di funzionare a 170-175°C.

4.1.2. Autoclave termostatabile a 121 ± °C.

4.1.3. Termostato, regolabili ad una temperatura uniforme di :
a) 6 ± 0,2°C.
b) 21 ± 1°C

4.1.4. pHmetro, con compensazione della temperatura e con una precisione di ± 0,1 unità pH.

4.1.5. Bagnomaria, regolabile a 45 ± 1°C.

4.1.6. Lente, ingrandimento 2-4x.

4.1.7. Lente, ingrandimento 8-10x.

4.1.8. Apparecchio contacolonie.

4.1.9. Mescolatore, in grado di mescolare 1 ml del campione di latte o della diluizione decimale con 9 ml del diluente ed il cui funzionamento sia basato sul principio della rotazione eccentrica del contenuto della provetta.

4.2. Vetreria

4.2.1. Provette, con opportuna chiusura, di capacità sufficiente a contenere 10 ml della prima diluizione, oppure delle diluizioni decimali successive, (lasciando lo spazio necessario per la miscelazione).

4.2.2. Palloni, da 150 à 250 ml oppure provette, da circa 20 ml, per contenere il mezzo di coltura.

4.2.3. Pipette, chiuse ad una estremità con un batuffolo di cotone in vetro o in materiale sintetico sterile, con punta, della capacità nominale di 1 ml aventi un foro di scorrimento del diametro di 1,75 - 3 mm.

4.2.4. Piastre di Petri, in vetro trasparente incolore o in materiale sintetico sterile, con un fondo avente un diametro interno di circa 90-100 mm. L'altezza interna deve essere di almeno 10 mm. Il fondo non deve presentare alcuna irregolarità che possa interferire con le colonie da contare.

4.2.5. Sterilizzazione della vetreria:

La vetreria deve essere sterilizzata con uno dei seguenti metodi :

a) mantenendola a 170 - 175°C in una stufa ad aria calda (4.1.1.) per almeno 1 ora;

b) mantenendola a 121 ±1°C in autoclave (4.1.2.) per almeno 20 minuti.

Fare particolare attenzione a che nell'autoclave si abbia una adeguata penetrazione del vapore - ad esempio se l'attrezzatura è sterilizzata in recipienti, questi non devono essere chiusi ermeticamente e i tappi dei palloni non devono essere serrati.

La vetreria sterilizzata in autoclave deve essere asciugata facendo scaricare il vapore.

Le pipette devono essere sterilizzate in una stufa ad aria calda (4.1.1.).

5. TERRENO COLTURALE - LATTE AGARIZZATO PER IL CONTEGGIO IN PIASTRA

5.1. Composizione

Estratto di lievito	2,5 g
Triptone	5,0 g
Glucosio D(+)o destrosio	1,0 g
Latte screm. in polvere	1,0 g
Agar	da 10 a 15 g, a seconda delle proprietà gelatinizzanti dell'agar impiegato
Acqua	1.000 ml

Il latte scremato in polvere deve essere esente da sostanze inibenti. Ció deve essere verificato con prove comparative usando un latte scremato in polvere che sia stato accertato esente da sostanze inibenti.

Preparazione:

Disperdere e sciogliere gli ingredienti in acqua nel seguente ordine: estratto di lievito, triptone, glucosio ed infine latte scremato in polvere. Tale operazione risulterà più facile riscaldando la sospensione. Aggiungere l'agar e portare ad ebollizione agitando in continuazione fino a sciogliere completamente l'agar oppure riscaldare a vapore per circa 30 minuti.

Filtrare eventualmente su carta da filtro.

Verificare il pH con pHmetro (4.1.4.) ed aggiustarlo evenutalmente con una soluzione (almeno 0,1 mol/l) di idrossido di sodio o di acido cloridrico in modo che, dopo sterilizzazione, si abbia a 25°C un pH 6,9 ± 0,1.

5.2. Distribuzione, sterilizzazione e conservazione del terreno di coltura

Distribuire il terreno (5.1.) con aliquote di 100 - 150 ml per pallone o di 12 - 15 ml per provetta (4.2.2.). Tappare i palloni e le provette.

Sterilizzare in autoclave (4.1.2.) a 121 ± °C per 15 minuti.

Verificare il pH del terreno.

Se il terreno di coltura non deve essere immediatamente utilizzato, conservarlo al riparo dalla luce ad una temperatura compresa fra 0 e 5°C per non più di un mese dopo la preparazione.

5.3. Terreno di coltura disidratato disponibile in commercio

Il terreno di coltura (5.1.) puó essere preparato a partire da un terreno disidratato reperibile in commercio. Seguire in questo caso le istruzioni del fabbricante aggiungendo, prima della dissoluzione, se non fosse presente fra gli ingredienti il latte scremato in polvere.

Aggiustare il pH a 6,9 ± 0,1 a 25°C come descritto al punto 5.1. e distribuire, sterilizzare e conservare il terreno secondo il procedimento di cui al punto 5.2.

6. DILUENTI

6.1. Soluzione salina/peptone

Composizione

Peptone	1,0 g
Cloruro di sodio (NaCl)	8,5 g
Acqua	1.000 ml

Preparazione

Sciogliere gli ingredienti in acqua, riscaldando se occorre.

Verificare con un pHmetro (4.1.4.) il pH ed aggiustarlo eventualmente con una soluzione (almeno 0,1 mol/l) di idrossido di sodio o acido cloridrico in modo che, dopo sterilizzazione, il pH a 25°C sia 7,0 ± 0,1.

6.2. Distribuzione, sterilizzazione e conservazione del diluente

Distribuire il diluente (6.1.) nelle provette (4.2.1.) in quantità tali che a sterilizzazione avvenuta ciascuna provetta contenga, 9,0 ml ± 0,2 di diluente. Tappare le provette.

Sterilizzare in autoclave (4.1.2.) a 121 ± °C per 15 minuti.

Verificare il pH del diluente.

Se non deve essere usato immediatamente, conservare il diluente al riparo dalla luce e ad una temperatura compresa tra 1 e 5°C per non più di un mese dopo la preparazione.

6.3. Diluenti disidratati disponibili in commercio

I diluenti (6.1.) possono essere preparati a partire da compresse o polveri disidratate disponibili in commercio. Seguire le istruzioni del fabbricante. Aggiustare il pH come descritto al punto 6.1. e distribuire, sterilizzare e conservare i diluenti come descritto in 6.2.

7. PROCEDIMENTO

7.1. Fusione del terreno di coltura

Prima di procedere all'esame microbiologico, far fondere rapidamente la quantità di terreno necessaria e portare quindi il terreno a 45 ± 1°C in bagnomaria (4.1.5.).

7.2. Preparazione del campione di latte

7.2.1. Mettere a preincubare una confezione non aperta di latte pastorizzato o, se non è possibile un campione rappresentativo di non meno di 100 ml in un termostato (4.1.3.a.) a 6°C per 120 ± 2 ore.

7.2.2. Al termine della preincubazione mescolare a fondo, capovolgendo rapidamente per 25 volte il contenitore del campione di latte, in modo che i microorganismi siano distribuiti il più uniformemente possibile. Evitare la formazione di schiuma oppure lasciare che si disperda. Tra la miscelazione ed il prelievo dell'aliquota di analisi non devono trascorrere più di 3 minuti.

7.3. Preparazione della prima diluizione (10^{-1})

Aggiungere con una pipetta sterile (4.2.3.), 1 ml del campione di latte (7.2.2.) a 9 ml di diluente (6.1), evitando di toccare il diluente con la pipetta. La temperatura del diluente deve essere approssimativamente uguale a quella del campione di latte. Mescolare accuratamente la prima diluizione con il mescolatore (4.1.9.) per 5 - 10 secondi.

Si ottiene cosi' la prima diluizione 10^{-1}.

7.4. Preparazione delle diluizioni decimali successive

Trasferire con una pipetta sterile (4.2.3.), 1 ml della prima diluizione (7.3.) in 9 ml di diluente (6.1.), seguendo le istruzioni date in 7.3.

Si ottiene cosi' la diluizione 10^{-2}.

Ripetere queste operazioni per ottenere ulteriori diluizioni decimali sino a quando si ritiene di avere ottenuto un numero adeguato di microrganismi (8.1.).

7.5. Semina delle piastre di Petri

Trasferire con una pipetta sterile (4.2.3.), 1 ml del campione e/o della diluizione decimale appropriata in una piastra (4.2.4.). L'esame deve essere effettuato su almeno due diluizioni. Per ciascuna diluizione scelta come appropriata (8.1.) preparare due piastre.

7.6. Distribuzione del terreno di coltura

Versare circa 15-18 ml del terreno (7.1.) in ciascuna delle piastre inoculate.

Appena versato il terreno di coltura mescolare facendo ruotare la piastra di Petri in modo da ottenere dopo l'incubazione una distribuzione uniforme delle colonie.

Tra la fine della preparazione del campione di latte e la miscelazione della diluizione con il terreno non devono trascorrere più di 15 minuti. Lasciare quindi solidificare su una superficie orizzontale pulita e fredda.

7.7. Incubazione delle piastre di Petri

Mettere in termostato (4.1.3.b) le piastre capovolgendole. Non impilare più di sei piastre alla volta. Le pile di piastre non devono venire a contatto tra di loro né con le pareti o con la parte superiore del termostato.

Mettere a incubare a 21 ± 1°C per 25 ore.

7.8. Conteggio delle colonie

Contare le colonie delle piastre di Petri che non contengono più di 300 colonie.

Esaminare le scatole a luce attenuata. Per contare più facilmente si possono usare opportune lenti (4.1.6.) e/o un apparecchio contacolonie (4.1.8.). Evitare di confondere particelle di precipitato nelle piastre con le colonie puntiformi. In caso di dubbio, esaminarle con attenzione ricorrendo eventualmente ad una lente d'ingrandimento più forte (4.1.7.) per distinguere le colonie dalle sostanze estranee.

Le colonie invasive devono essere contate come singole colonie. Se queste ricoprono meno di un quarto della piastra contare le colonie sulla parte restante della stessa calcolando quindi il numero corrispondente per l'intera piastra. Scartare invece la piastra se le colonie invasive ne ricoprono più di un quarto.

8. CALCOLO ED ESPRESSIONE DEI RISULTATI

8.1. Utilizzare i risultati relativi a quelle piastre che contengono da 10 a 300 colonie (cfr. 8.3. e 8.4.).

8.2. Il numero di microrganismi in 1 ml di latte pastorizzato è dato dalla formula :

$$\frac{\sum c}{(n_1 + 0{,}1\, n_2)d}$$

dove

$\sum c$ è la somma del numero di colonie contate secondo il procedimento di cui al punto 8.1.,

$(n_1 + 0{,}1\, n_2)d$ è uguale al volume di campione inoculato in cui :

n_1 è il numero di piastre utilizzate per la prima diluizione,

n_2 è il numero di piastre utilizzate per la seconda diluizione,

d è il fattore di diluizione relativo ai primi conteggi effettuati.

Il risultato è approssimato a due cifre significative. Quando la cifra che deve essere arrotondata è 5, effettuare l'approssimazione in modo che la cifra immediatamente a sinistra sia un numero pari.

__Esempio__

diluizione 10^{-2}: 278 e 290 colonie

10^{-3}: 33 e 28 colonie

$$\text{numero/ml} = \frac{278+290+33+28}{(2+0{,}1 \times 2)\ 10^{-2}}$$

$$= \frac{629}{0{,}022} = 28590 = 29000 = 2{,}9 \times 10^{4}$$

8.3. Se tutti i calcoli danno meno di 10 colonie, indicare che il numero di microrganismi per millilitro è "inferiore a 10 x d per ml"; dove "d" è il reciproco del fattore di diluizione più basso.

8.4. Se tutti i calcoli danno più di 300 colonie ma il conteggio è possibile, procedere ad una stima e moltiplicare tale valore per il reciproco del fattore di diluizione. Riportare il risultato come "numero probabile di microrganismi per ml".

9. __PRECISIONE__

Non sono disponibili risultati di prove interlaboratorio accettate a livello internazionale.

VI. NUMERAZIONE DEI COLIFORMI - CONTEGGIO DELLE COLONIE A 30°C

1. OGGETTO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Il presente procedimento descrive il metodo di riferimento per la enumerazione dei coliformi nel latte pastorizzato con la tecnica del conteggio delle colonie a 30°C.

2. DEFINIZIONE

Con il termine "coliformi" si intendono i batteri che a 30°C formano colonie caratteristiche o non caratteristiche che fermentano il lattosio con formazione di gas nelle condizioni descritte.

3. PRINCIPIO

Si mescola un volume definito del campione di latte con il terreno di coltura nelle piastre di Petri che vengono messe a incubare a 30°C per 24 ore. Si contano le colonie caratteristiche e se necessario si conferma l'identità di quelle non caratteristiche dopo verifica della loro capacità di fermentare il lattosio. Si calcola quindi il numero di coliformi per 1 ml di latte pastorizzato.

4. APPARECCHIATURA E VETRERIA

Materiale di uso comune in laboratorio e in particolare :

4.1. Apparecchiatura

4.1.1. Stufa ad aria calda, in grado di operare a 170-175°C.

4.1.2. Autoclave, termostatabile a 121 ± °C.

4.1.3. Termostato, regolabile ad una temperatura uniforme di 30 ± 1°C.

4.1.4. pHmetro, con compensazione automatica della temperatura e precisione di ± 0,1 unità pH.

4.1.5. Bagnomaria, in grado di funzionare a 45 ± 1°C.

4.1.6. Ansa metallica in platino-iridio o nickel-cromo.

4.2. Vetreria

4.2.1. Provette con chiusure appropriate da 20 ml per contenere il terreno di coltura per la conferma (5.2.) e tubi di fermentazione di Durham di dimensioni adatte all'impiego con le provette.

4.2.2. Palloni da 150 a 250 ml per contenere il terreno di coltura solido selettivo (5.1.).

4.2.3. Pipette, con una estremità chiusa con batuffolo di cotone in vetro o in materiale sintetico sterile, con punta a foro normale, della capacità nominale di 1-10 ml, con diametro del foro di scorrimento compreso tra 1,76 e 3 mm.

4.2.4. Piastre di Petri, in vetro trasparente incolore o in materiale sintetico sterile, con diametro interno del fondo della scatola di circa 90-100 mm. L'altezza interna deve essere di almeno 10 mm. Il fondo non deve presentare irregolarità che possano interferire con le colonie da contare.

4.2.5. Sterilizzazione della vetreria

La vetreria deve essere sterilizzata con uno dei metodi seguenti :

a) mantenendola alla temperatura di 170-175°C per almeno 1 ora in una stufa ad aria calda (4.1.1.);
b) mantenendola in autoclave (4.1.2.) a 121 ± 1°C per almeno 20 minuti;

Fare attenzione a che nell'autoclave si abbia un'adeguata penetrazione del vapore; ad esempio gli eventuali recipienti nei quali si pone il materiale da sterilizzare non devono essere chiusi ermeticamente e i tappi dei palloni non devono essere serrati.

La vetreria sterilizzata in autoclave deve essere asciugata facendo fuoruscire il vapore.

Le pipette devono essere sterilizzate in una stufa ad aria calda (4.1.1.).

5. TERRENI COLTURALI

5.1. "Violet Red Bile Lactose Agar" (Agar VRBL). Terreno colturale solido selettivo.

Composizione

Peptone	7 g
Estratto di lievito	3 g
Lattosio ($C_{12}H_{22}O_{11}.H_2O$)	10 g
Cloruro di sodio (NaCl)	5 g
Sali biliari	1,5 g
Rosso neutro	0,03 g
Cristalvioletto	0,002 g
Agar	10-15 g (a seconda delle proprietà gelatinizzanti dell'agar usato)
Acqua	1.000 ml

Preparazione

Disperdere e sciogliere gli ingredienti in acqua e lasciare riposare per alcuni minuti. Mescolare quindi energicamente.

Verificare il pH con un pHmetro (4.1.4.) ed aggiustarlo eventualmente con una soluzione (almeno 0,1 mol/l) di idrossido di sodio o acido cloridrico, in modo che ad ebollizione avvenuta si abbia a 25°C un pH 7,4.

Portare rapidamente ad ebollizione, agitando di tanto in tanto e distribuire immediatamente il terreno in ragione di 100 - 150 ml. in palloni sterili (4.2.2.). Raffreddare quindi in bagnomaria (4.1.5.) a 45° ± 1°C.

Controllare la sterilità del terreno al momento dell'uso (cfr. 6.4.).

Impiegare il terreno entro 3 ore dalla preparazione.

5.2. "Brilliant Green Lactose Bile Broth". Terreno colturale di conferma.

Composizione

Peptone	10 g
Lattosio ($C_{12}H_{22}O_{11}\cdot H_2O$)	10 g
Bile di bue disidratata	20 g
Verde brillante	0,0133 g
Acqua	1.000 ml

Preparazione

Sciogliere gli ingredienti in acqua portando ad ebollizione.

Verificare il pH con un pHmetro (4.1.4.) ed eventualmente aggiustarlo con una soluzione (almeno 0,1 mol/l) di idrossido di sodio o di acido cloridrico in modo che, a sterilizzazione avvenuta, si abbia a 25°C un pH 7,2 ± 0,1.

Distribuire il terreno in ragione di 10 ml nelle provette contenenti i tubi di Durham. Chiudere le provette.

Sterilizzare per 15 minuti in autoclave (4.1.2.) a 121 ± °C.

Dopo la sterilizzazione i tubi di Durham non devono contenere bolle d'aria.

Verificare il pH del terreno colturale.

Se non è utilizzato subito, conservare il terreno al riparo dalla luce per non più di un mese dopo la preparazione, ad una temperatura compresa tra 0 e 5°C.

5.3. Terreni di coltura disidratati disponibili in commercio

I terreni di coltura (5.1., 5.2.) possono essere preparati a partire da terreni disidratati reperibili in commercio. Seguire in tal caso le istruzioni del fabbricante. Aggiustare il pH e distribuire, bollire o sterilizzare e conservare i terreni secondo i procedimenti descritti in 5.1. e 5.2.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Terreno culturale

Usare il terreno (agar VRBL) come descritto al punto 5.1.

6.2. Preparazione del campione di latte

Rimescolare completamente il campione di latte capovolgendo rapidamente per 25 volte il recipiente contenente il campione in modo che i microrganismi siano distribuiti il più uniformemente possibile. Evitare la formazione di schiuma o lasciare che si disperda. Tra la miscelazione ed il prelievo dell'aliquota di analisi non devono trascorrere più di 3 minuti.

6.3. Semina delle piastre di Petri

Seminare 3 ml del campione di latte (6.2.) trasferendo con una pipetta sterile (4.2.3) 1 ml del campione di latte in ciascuna delle tre piastre (4.2.4.).

6.4. <u>Distribuzione del terreno colturale</u>

Versare 12 ml circa di agar VRBL (6.1.) in ciascuna delle inseminate.

Appena versato il terreno colturale mescolare facendo ruotare la piastra di Petri in modo da ottenere dopo l'incubazione una distribuzione uniforme delle colonie.

Tra la fine della preparazione del campione di latte e la miscelazione dell'aliquota di analisi con il terreno non devono trascorrere più di 15 minuti.

Preparare come controllo per la sterilità una piastra non seminata versandovi 12 ml dell'Agar VRBL usato per le piastre seminate.

Lasciare riposare su una superficie orizzontale pulita e fredda sino a quando il terreno non si sia solidificato.

A solidificazione completamente avvenuta versare almeno 4 ml di agar VRBL (6.1.) sulla superficie del terreno inoculato.

Lasciare solidificare.

6.5. <u>Incubazione delle piastre di Petri</u>

Trasferire le piastre nel termostato (4.1.3.), capovolgendole. Non impilare più di sei piastre alla volta. Le pile di piastre non devono venire a contatto tra di loro né con le pareti o con la parte superiore del temostato.

Incubare a 30 ± 1°C per 24±2 ore.

6.6. <u>Conta delle colonie</u>

6.6.1. Contare le colonie nelle piastre di Petri contenenti non più di 150 colonie. Contare le colonie di colore rosso scuro aventi un diametro di almeno 0,5 mm, con o senza precipitato intorno, caratteristiche per i coliformi.

6.6.2. Se tutte le colonie o parte di esse hanno un aspetto non caratteristico (ad es. differiscono nel colore, nelle dimensioni o nella formazione di precipitato dalle colonie tipiche effettuare un saggio di conferma (6.7.).

6.7. <u>Saggio di conferma</u>

Sulla base delle indicazioni date in 6.6.2., effettuare un saggio di conferma su un adeguato numero (p. es. 3-5) di colonie non caratteristiche inoculandole, con un'ansa metallica (4.1.6.), in provette di brodo "Brilliant Green Lactose Bile" (5.2). Mettere ad incubare le provette a 30 ± 1°C per 24 ± - 2 ore.

Considerare coliformi quelle colonie che nel tubo di Durham producono gas.

7. <u>CALCOLO ED ESPRESSIONE DEI RISULTATI</u>

7.1. Utilizzare i risultati delle conte (cfr. 7.4.) relative alle piastre che contengono non più di 150 colonie

7.2. Nel caso del saggio di conferma, calcolare il numero di colonie di coliformi in base alla percentuale di colonie di coliformi confermate.

7.3. Il numero di coliformi in 1 ml di latte pastorizzato è dato dalla formula:

$$\frac{\sum c}{n}$$

dove

$\sum c$ è il numero totale di colonie di coliformi (7.1 in relazione con 7.2) risultato dall'esame del campione di latte (3 ml).

n è il numero di millilitri del campione esaminato (6.31) (3 ml).

Quando si hanno più di 100 colonie il risultato è approssimato a due cifre significative. Quando la cifra da arrotondare è 5, arrotondare in modo che la cifra immediatamente a sinistra sia un numero pari.

7.4. Se si ottengono soltanto conteggi con numero di colonie superiore a 150 indicare il risultato come "numero probabile di coliformi in 1 ml di prodotto".

8. PRECISIONE

Non sono disponibili risultati di prove interlaboratorio accettate a livello internazionale.

VII. NUMERAZIONE DELLE CELLULE SOMATICHE

Il presente procedimento descrive due metodi come metodi di riferimento per la enumerazione delle cellule somatiche.

A. Il metodo microscopico

B. Il metodo fluoro-opto-elettronico

A. METODO MICROSCOPICO

1. OGGETTO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Il presente procedimento descrive il metodo di riferimento per la enumerazione delle cellule somatiche nel latte crudo.

Il presente procedimento descrive il metodo per la determinazione del numero di cellule nel campione di latte per tarare e verificare l'accuratezza del metodo fluoro-opto-elettronico (cfr. B.1).

2. DEFINIZIONE

Ai fini del presente metodo per cellule somatiche si intendono quelle cellule, quali leucociti e cellule epiteliali, i cui nuclei possono essere distintamente colorati con il blu di metilene.

3. PRINCIPIO

0,01 ml di latte vengono distribuiti su un'area di 1 cm2 di vetrino. Il film viene quindi essiccato e colorato. Per il conteggio si usa un microscopio. Il numero di cellule contenute in 1 ml si ottiene moltiplicando il numero di cellule somatiche contate in un'area determinata per il fattore di lavoro.

4. REATTIVI

Le sostanze usate devono essere di purezza analitica.

Soluzione colorante :

Composizione

Blu di metilene	0,6 g
Etanolo - 99 %	54 ml
1,1,1-tricloroetano oppure tetracloroetano	40 ml
Acido acetico glaciale	6 ml

Avvertenza : il tetracloroetano è velenoso. Nel caso venga usato, la preparazione del colorante e l'applicazione sul vetrino devono essere effettuate sotto cappa.

Preparazione

Mescolare l'etanolo con l'1,1,1,-tricloroetano o il tetracloroetano in una bottiglia e riscaldare a bagnomaria a 60-70°C. Addizionare il blu di metilene, mescolare accuratamente, raffreddare in frigorifero a 4° C per 12-24 ore ed aggiungere acido acetico glaciale. Filtrare su filtro con diametro dei pori non superiore ai 10-12 micron e conservare la soluzione colorante in una bottiglia a tenuta d'aria. Se si sono formati granelli o sedimenti, prima dell'uso filtrare nuovamente.

5. APPARECCHIATURA E VETRERIA

5.1. Microscopio, con ingrandimento di 500-1.000.

5.2. Microsiringa, 0,01 ml con precisione non inferiore a +/- 2 %.

5.3. Vetrino con campo delimitato di 20 mm x 5 mm per il film, oppure un vetrino standard ed una sagoma di 20 mm x 5 mm delimitante il campo per il film.

5.4. Piastra riscaldante livellata, (30÷50° C) per essiccare i vetrini.

5.5. Phon per asciugare il film.

5.6. Bagnomaria, termostatabile a 30-40° C per riscaldare il campione di latte.

5.7. Vetrino micrometrico di riferimento, con intervalli di 0,01 mm.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Campione di latte
Il campione di latte deve essere analizzato entro 6 ore dal campionamento. La temperatura di conservazione non deve superare i 6° C. Occorre evitare il congelamento.

6.2. Preparazione del campione nel laboratorio
Riscaldare il campione in bagnomaria (5.6.) a 30-40°C. Mescolare quindi con cura. Raffreddare alla temperatura alla quale è stata tarata la microsiringa (5.2.), ad esempio 20°C.

6.3. Pre-trattamento dei vetrini
Pulire i vetrini (5.3.), ad esempio con etanolo, asciugare con carta che non lasci particelle, esporre alla fiamma e raffreddare. Conservare in una scatola per evitare la polvere.

6.4. Preparazione del film
Prelevare con una microsiringa (5.2.) 0,01 ml di latte dal campione preparato come descritto. Pulire accuratamente la parte esterna della siringa che viene a contatto con il latte. Portare la siringa sul vetrino (5.3.) seguendo dapprima il contorno del rettangolo (20 mm x 5 mm) e ricoprendo quindi tutta la superficie il più uniformemente possibile. Porre il vetrino su una piastra riscaldante livellata (5.4.) fino a essiccazione completa.

Per ciascun campione di latte devono essere preparati ed analizzati almeno due film.

6.5. Colorazione dei film

Immergere nella soluzione colorante (4.) per 10 minuti. Essiccare, completando eventualmente con il phon (5.5.). Immergere i film in acqua di rubinetto fino ad asportare tutto il colore in eccesso. Essiccare quindi nuovamente e conservare al riparo dalla polvere.

6.6. Taratura del campo microscopico

Sulla base dell'ingrandimento scelto (500x-1000x) determinare il diametro del campo microscopico con il vetrino micrometrico di riferimento.

7. CONTEGGIO E CALCOLO

7.1. Conta delle cellule

Con il microscopio (5.1.). Contare anziché le cellule soltanto i loro nuclei. Questi sono chiaramente riconoscibili e per la conta almeno la metà del nucleo deve essere visibile nel campo microscopico. Contare le strisce o i campi nel terzo centrale del film, evitando di prendere in considerazione quelli che ricadono esclusivamente nelle zone periferiche del film. L'accuratezza con cui sono stati preparati i film e quindi l'attendibilità dei risultati, deve essere controllata almeno una volta al mese eseguendo la conta in varie parti del film. Il conteggio puó essere anche effettuato contando i campi microscopici ripartiti in modo tale che tutte le parti del film siano ugualmente rappresentate.

7.2. Numero minimo di cellule da contare

Poichè la conta delle cellule somatiche al microscopio puo' essere anche usata per la standardizzazione dei procedimenti di conteggio automatico e meccanizzato, il coefficiente di variazione delle conte su campioni identici non deve risultare più elevato di quello ottenuto

con strumenti elettronici. Il coefficiente di variazione per un campione di latte contenente 400.000 - 600.000 cellule/ml non deve superare il 5 %.

Per ottenere questo valore di ripetibilità il numero di cellule somatiche da contare per ciascun campione deve essere, in base alle caratteristiche della distribuzione di Poisson, di almeno 400.

La distribuzione di Poisson presuppone

$$M = V = s^2,$$

dove

M è il valore medio
V è la varianza e
s è la deviazione standard.

Il coefficiente di variazione è :

$$CV = \frac{s \times 100}{M}\ \% \text{ oppure } CV = \frac{100}{s}\ \% \text{ oppure } CV = \frac{100}{\sqrt{M}}\ \%$$

dove M (media) indica il numero di particelle (cellule) che sono state contate (cioè 400 per CV = 5 %).

7.3. <u>Calcolo del fattore di lavoro</u>

Nel caso di 0,01 ml di latte il fattore di lavoro è calcolato secondo 7.3.1. o 7.3.2.

7.3.1. <u>Conteggio delle strisce tracciate trasversalmente al film</u>

La lunghezza di ciascuna striscia su cui effettuare la conta è di 5 mm mentre la larghezza corrisponde al diametro del campo microscopico delimitato dal vetrino micrometrico di riferimento (5.7.).

$$\text{Fattore di lavoro} = \frac{20 \times 100}{d \times b}$$

dove

d è il diametro del campo microscopico in mm, delimitato dal vetrino micrometrico di riferimento

b è il numero di strisce su cui la conta è stata effettuata per intero.

7.3.2. Effettuando la conta dei campi microscopici nel terzo centrale del film oppure mediante la griglia

$$\text{Fattore di lavoro} : \frac{20 \times 5 \times 100}{\pi \times \frac{d2}{4} \times s} = \frac{12732}{d^2 \times s}$$

dove

d è il diametro del campo microscopico in mm delimitato dal vetrino micrometrico di riferimento (5.7.)

s è il numero di campi in cui è stata effettuata la conta.

7.4. Calcolo del tenore in cellule

Si moltiplica il numero di cellule somatiche contate (7.1. e 7.2.) per il fattore di lavoro (7.3.), ottenendo il numero di cellule per ml di latte.

7.5. Precisione

Il coefficiente di variazione (cfr. 7.2.) non deve essere superiore al 5 %.

Per la precisione non sono disponibili risultati di prove interlaboratorio accettate a livello internazionale.

7.6. Riproducibilità (R)

La deviazione standard (coefficiente di variazione) (cfr. 7.2.) non deve essere superiore al 10 %.

B. METODO FLUORO-OPTO-ELETTRONICO

1. OGGETTO E CAMPO D'APPLICAZIONE

Il presente procedimento descrive il metodo di riferimento che, dopo opportuna taratura (cfr. A.1), puo' essere usato per la conta di cellule somatiche nel latte crudo - con o senza conservanti chimici.

2. DEFINIZIONE

Ai fini del presente metodo con il termine cellule somatiche si intendono le particelle aventi una intensità di fluorescenza minima dovuta alla colorazione del DNA del nucleo.

3. PRINCIPIO

Si mescola a fondo una parte del campione (ad es. 0,2 ml) con una soluzione tampone ed una soluzione fluorescente. Parte di tale miscela viene trasferita sotto forma di un film sottile su un disco rotante che funge da piano portaoggetti per il microscopio.
Ogni cellula produce un impulso elettrico che viene amplificato e registrato. Il numero di cellule somatiche viene espresso in migliaia per ml.

4. REATTIVI

Salvo altre indicazioni i reattivi devono essere di purezza analitica. L'acqua deve essere distillata, deionizzata o di purezza equivalente.

4.1. Soluzione tampone

Composizione

Ftalato acido di potassio	51,0 g
Idrossido di potassio	13,75 g
Polietileneglicol-mono-p- (1,1,3,3 -tetrametilbutil)-fenil-etere (ad es. Triton X-100), all'1 % in volume	10,0 ml

pH 5,7 - 5,9. Portare con acqua distillata a 10 000 ml.

Preparazione

Miscelare i vari ingredienti. Puo' essere conservata in recipienti a tenuta d'aria per non oltre 7 giorni.

4.2. Soluzione fluorescente (soluzione madre)

Composizione

Bromuro di etidio 1,0 g

Portare con acqua a 1.000 ml.

Preparazione

Si scioglie in acqua il bromuro di etidio. La soluzione puo' essere conservata al massimo per 2 mesi in una bottiglia a tenuta di luce e d'aria.

4.3. Soluzione fluorescente (soluzione di lavoro)

Portare a 1 000 ml con la soluzione tampone (4.1.) 20 ml della soluzione madre (4.2) e mescolare. La soluzione di lavoro deve essere utilizzata entro 7 giorni.

4.4. Soluzione detergente

Composizione

Soluzione tampone (4.1.)	10 ml
Polietileneglicol-mono-p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenil-etere (ad es. Triton X-100), all'1 % in volume	10 ml
Ammoniaca, 25 % in volume	25 ml

Portare con acqua a 10 000 ml.

Preparazione

Miscelare i vari ingredienti. Conservare al massimo per 30 giorni.

5. APPARECCHIATURA E VETRERIA

5.1. Contatore, funzionante in base al principio ottico della fluorescenza.

Nota - Lo strumento deve essere tarato prima dell'uso. Si determina quindi la relazione tra il volume delle particelle da contare e la soglia oltre la quale viene effettuato il conteggio. La taratura dell'apparecchiatura è effettuata secondo le istruzioni del fabbricante usando campioni il cui numero di cellule è stato precedentemente determinato con il metodo microscopico (A).

5.2. Bagnomaria, con circolazione d'acqua, regolabile a 40 ± 1°C.

5.3. Provetta, con opportuna chiusura, da circa 15 ml.

6. IL CAMPIONE DI LATTE

6.1. Il campione deve essere conservato a bassa temperatura in una provetta (5.3.). Se il campione è privo di conservanti chimici, la conta non puo' essere effettuata nelle 24 ore successive alla mungitura in quanto si otterrebbero valori troppo bassi. La temperatura di conservazione non deve superare i 6°C.

6.2. Conservazione

La conservazione chimica deve essere effettuata entro 24 ore.

6.2.1. La conservazione chimica dei campioni puo' essere effettuata addizionando uno dei seguenti conservanti :

- Acido ortoborico

  La concentrazione finale dell'acido ortoborico nel campione non deve superare 0,6 g/100 ml. I campioni cosi' addizionati possono essere conservati al massimo per altre 24 ore a 6-12°C.

- Dicromato di potassio

  La concentrazione finale del dicromato di potassio non deve superare 0,2 g/100 ml. I campioni cosi' addizionati possono essere conservati al massimo per altre 72 ore alla temperatura di 6-12°C.

- Sodio azide

  Il campione puó essere conservato con azoturo di sodio ad una concentrazione finale di 0,024 g/100 ml, a condizione che venga raffreddato a 6 - 12°C subito dopo il campionamento e che la conta venga effettuata entro 48 ore dal campionamento stesso.

- Bronopol

  Il campione puó essere conservato con bronopol ad una concentrazione finale di 0,05 g/100 ml, purchè venga raffreddato alla temperatura di 6 - 12°C subito dopo il campionamento e la conta venga effettuata entro 72 ore dallo stesso.

6.2.2. Il campione già trattato con acido ortoborico puó essere conservato per altre 48 ore usando dicromato di potassio.

Nota - Per i campioni trattati con dicromato di potassio devono essere rispettate le norme locali relative allo scarico degli effluenti.

7. PROCEDIMENTO

7.1. Pretrattamento del campione

Dopo la mungitura il latte da esaminare deve essere conservato per almeno 24 ore a circa 2-6°C. Se i campioni non sono stati pretrattati, si sconsiglia di effettuarne il conteggio il giorno stesso della mungitura perchè si potrebbero ottenere risultati troppo bassi. Qualora si debba assolutamente procedere al conteggio, il campione deve essere pretrattato per almeno tre ore con dicromato di potassio (cfr. 6.2.1.).

7.2. Preparazione

Si riscalda in bagnomaria (5.2.) termostatato a circa 40°C il campione pretrattato (cfr. 7.1.) o il campione non trattato munto da almeno un giorno. Lo si mantiene quindi a temperatura ambiente sino a conta ultimata.

7.3. Conta delle cellule

La conta va effettuata con il contatore (5.1.) entro 15 minuti dalla fine del trattamento termico (cf. 7.2.). Il campione deve essere mescolato a fondo subito prima della conta al fine di ottenere una distribuzione delle cellule somatiche che sia la più omogenea possibile.

L'ulteriore diluzione e la preparazione del campione si effettuano automaticamente nello strumento.

8. PRECISIONE

Non si dispone di valori della ripetibilità (r) e della riproducibilità (R) ottenuti con prove interlaboratorio accettate a livello internazionale. In futuro verranno fissati dei valori per quanto riguarda la precisione.
Sulla base dei dati disponibili a livello nazionale si possono effettuare le seguenti stime;

numero delle cellule compreso fra 400.000 e 500.000/ml

- deviazione standard per la ripetibilità
  S_2 = 20.000 cellule/ml
  (pari ad un coefficiente di variazione del 5% - 4%)

- deviazione standard per la riproducibilità:
  S_R = 40.000 cellule/ml
  (pari ad un coefficiente di variazione del 10% - 8%)

9. CONTROLLO DELL'ACCURATEZZA

Il controllo dell'accuratezza è effettuato usando campioni il cui tenore di cellule (P) è noto essendo stato determinato per conteggio delle cellule al microscopio in un laboratorio nazionale di riferimento.

VIII. RICERCA DI ANTIBIOTICI E SULFAMIDICI

OGGETTO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Il presente procedimento descrive il metodo di riferimento per la ricerca di antibiotici e sulfamidici nel latte crudo e nel latte trattato termicamente.

Il metodo di riferimento si suddivide in :

METODO QUALITATIVO

E' il metodo che consente una prima selezione dei campioni di latte contenenti antibiotici e sulfamidici. Il metodo descritto è uno di quei metodi, simili fra loro, che si basano sull'uso del Bacillus stearothermophilus, varietà calidolactis, ATCC 10149 come microrganismo-test. Il metodo è stato scelto come rappresentativo di questo tipo di prove.

METODO DI CONFERMA ED IDENTIFICAZIONE DELLA PENICILLINA

Il presente metodo deve essere usato per confermare i risultati del procedimento qualitativo, per identificare la penicillina e determinarne la concentrazione.

A. METODO QUALITATIVO

1. OGGETTO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Il procedimento descrive la tecnica di ricerca qualitativa, nel latte crudo ed in quello trattato termicamente, degli antibiotici e dei sulfamidici presenti in concentrazione superiore ai limiti fissati nella tabella :

Limiti di rivelazione di vari antibiotici e sulfamidici (*)

	Sensibilità della prova	
	Completamente negativo	Completamente positivo
Benzilpenicillina	0,02	0,006
Ampicillina	0,002	0,005
Cloxacillina	0,015	0,035
Nafcillina	0,006	0,011
Tetraciclina	0,10	0,40
Ossitetraciclina	0,20	0,45
Clortetraciclina	0,15	0,50
Cloramfenicolo	(7	15
Diidrostreptomicina	(4	13
Neomicina	(1	22
Kanamicina	(9	28
Bacitracina	0,06	0,14
Eritromicina	1	2,25
Rifamicina	0,01	0,14
Diafenilsolfone	0,01	0,1
Sulfametazina, Sulfadimidina	0,5	1

* La benzilpenicillina e la bacitracina sono espressi in UI/ml, tutti gli altri antibiotici in ug/ml.

2. DEFINIZIONE

Se il colore del terreno colturale non cambia (cfr. 7.1.) il latte contiene antibiotici o sulfamidici.

3. PRINCIPIO

Un campione di latte viene aggiunto con i nutrienti ad un gel di agar contenente un indicatore di pH e spore di Bacillus stearothermophilus, varietà calidolactis ATCC 10149 (cfr. 5.4.1.), che nel complesso ha una buona sensibilità ed è particolarmente sensibile all'effetto inibente della penicillina. L'incubazione che provoca la normale crescita dell'organismo e sua produzione di acido fa cambiare il colore dell'indicatore di pH da rosso porpora a giallo.
La presenza nel latte di sostanze che inibiscono la crescita dell'organismo fanno si' che l'indicatore di pH mantenga il colore rosso porpora.

4. APPARECCHIATURA E VETRERIA

Materiale di uso comune in laboratorio e in particolare :

4.1. Apparecchiatura

4.1.1. Termostato, regolabile a 64 ± 1°C

4.1.2. Bagnomaria termostatato a 64 ± 1°C

4.1.3. Rastrelliera per le provette o le fiale

4.1.4. Pipetta con punta monouso per campionamento e dosaggio di 0,1 ml

4.1.5. Pinze o pinzette

4.1.6. Stufa ad aria calda funzionante a 170-175°C

4.1.7. Autoclave regolata a 121 ± 1°C

4.1.8. pH metro

4.2. Vetreria

4.2.1. Bottiglie per campioni con adeguate chiusure

Nota : Certi tappi di gomma possono rilasciare sostanze inibenti sulle pareti del collo della bottiglia.

4.2.2. Piastre di Petri in vetro incolore trasparente o in materiale sintetico sterile con fondo piatto di spessore uniforme, e diametro interno minimo di circa 140 mm

4.2.3. Bottiglie da 250 ml

4.2.4. Pipette, (con una estremità chiusa da un batuffolo di cotone) sterili in vetro o di materiale sintetico sterile della capacità nominale di 1 ml e di 10 ml

4.2.5. Spatole di vetro

4.2.6. Provette o ampolle, con diametro interno di circa 8 mm, con cappuccio tappo

4.2.7. Sterilizzazione della vetreria

La vetreria deve essere sterilizzata con uno dei seguenti metodi :

a) mantenendola in una stufa ad aria calda (4.1.6.) alla temperatura di 170-175°C per almeno un'ora;
b) mantenendola in autoclave (4.1.7.) a 121°C ± 1°C per almeno 20 minuti.

Fare particolare attenzione a che nell'autoclave si abbia una adeguata penetrazione di vapore (ad esempio gli eventuali recipienti nei quali si pone il materiale da sterilizzare non devono essere chiusi ermeticamente e i tappi dei palloni e delle bottiglie non debbono essere serrati).

La vetreria sterilizzata in autoclave deve essere asciugata facendo fuoriuscire il vapore.

Le pipette devono essere sterilizzate in una stufa a secco.

5. TERRENI COLTURALI, SOLUZIONI, ORGANISMO-TEST, ETC.

Gli ingredienti dei terreni colturali devono essere del tipo per batteriologia. L'acqua usata deve essere distillata su vetro oppure demineralizzata di purezza almeno equivalente. Non deve inoltre contenere sostanze che inibiscano i microorganismi-test.

5.1. Terreni colturali

5.1.1. Agar nutritivo

Composizione

Estratto di lievito	2 g
Peptone	5 g
Estratto di carne	1 g
Cloruro di sodio	5 g
Agar	10-15 g
Acqua	1000 ml

Preparazione

Sciogliere in acqua i componenti. Portare ad ebollizione agitando di tanto in tanto. Aggiustare il pH in modo che a sterilizzazione avvenuta sia di 7,4 ± 0,1 a 25°C.

Distribuire con aliquote da 10 ml in provette per ottenere un terreno solidificato a becco di clarino oppure con aliquote da 100 ml in bottiglie.

Sterilizzare a 121 ± 1°Cper 15 minuti:

5.1.2. Terreno agarizzato

Composizione

Cloruro di sodio	2 g
Agar	15 g
Acqua	1000 ml
Soluzione di trimetoprim o tetroxoprim (cf. 5.1.3.) (*)	10 ml

(*) L'utilizzazione dei terreni di cultura contenenti sostanze anti-folati deve essere effettuata nel rispetto delle regole relative ai brevetti che le proteggono.

Preparazione

Sciogliere in acqua tutti i componenti eccetto il trimetoprim o il tetroxoprim. Portare ad ebollizione agitando di tanto in tanto. Aggiungere trimetoprim o tetroxoprim e sterilizzare a 121 ± 1°C per 15 minuti; aggiustare il pH in modo che, a sterilizzazione avvenuta, risulti a 25°C di 7,0 ± 0,1.

5.1.3. Soluzione di trimetoprim o tetroxoprim

Trimetoprim o tetroxoprim	5 mg/30 mg
Etanolo al 96 %	5 ml/30 ml
Acqua	fino a 1000 ml

Sciogliere il trimetoprim o tetroxoprim in etanolo (5 ml/ 30 ml) e diluir con acqua.

5.1.4. Terreno nutritivo

Estratto di lievito	0,75 mg
Glucosio	5,0 mg
Amido solubile	8,0 mg
Porpora di bromocresolo	0,025 g
Acqua	fino a 50 ml

Sciogliere in acqua, eventualmente riscaldando, i nutrienti e l'indicatore e sterilizzare per filtrazione.
Il terreno nutritivo agarizzato è disponibile in commercio in compresse.

5.2. Soluzioni standard di penicillina

5.2.1. Preparare, in una bottiglia sterile opportunamente tappata, una soluzione di penicillina da 60 ug/ml = (100 UI/ml) sciogliendo con benzilpenicillato di potassio o di sodio cristallino in acqua distillata sterile.

5.2.2. Preparare une soluzione di lavoro di penicillina portando a 1000 ml con acqua distillata sterile 1,25 ml della soluzione di penicillina (5.2.1.). Tale soluzione di lavoro contiene 0,075 ug/ml (= 0,125 UI/ml).

5.2.3. Preparare 75 ml di una soluzione standard di penicillina contenente 0,004 ug/ml (= 0,0067 UI/ml) di penicillina aggiungendo 71 ml di latte esente da sostanze inibenti (5.3.) a 4 ml di soluzione di lavoro di penicillina (5.2.2.) e mescolando.

5.2.4. Le soluzioni di penicillina descritte ai punti 5.2.1. - 5.2.3. devono essere preparate lo stesso giorno in cui viene effettuato il saggio.

5.3. Latte esente da sostanze inibenti
Preparare come controllo un latte esente da sostanze inibenti sciogliendo in acqua distillata sterile latte scremato (10% m/V), in cui sia stata previamente constatata l'assenza di sostanze inibenti. In alternativa si possono preparare alcune bottiglie di latte fresco in massa, in cui sia stata verificata l'assenza di sostanze inibenti, riscaldandolo per 1 ora a 100° C e conservandolo quindi in frigorifero a 0-6° C per non più di una settimana.

5.4. Organismo-test

5.4.1. Come organismo-test di prova si usa il *Bacillus stearothermophilus*, varietà *calidolactis*, ceppo ATCC 10149. Il ceppo ATCC 10149 è identico al C 953.

5.4.2. Preparare una coltura madre per conservare la coltura di analisi. Questa è mantenuta su agar nutritivo solidificato a becco di clarino (5.1.1). Inoculare il terreno con uno striscio sulla superficie dell'agar usando un'ansa di coltura di analisi e incubare in condizioni aerobiche per 48 ore a 63 ± 1°C. Dopo incubazione, chiudere ermeticamente la provetta con un tappo di gomma sterile. La soluzione madre cosi' ottenuta puo' essere conservata in frigorifero per diversi mesi a 0-5°C.

5.5. Preparazione della coltura di analisi (sospensione di spore)

5.5.1. Versare, in asepsi, 20 ml di agar nutritivo (5.1.1.) in una piastra di Petri sterile (4.2.2.) e raffreddare a temperatura ambiente.

5.5.2. Versare con una pipetta sterile (4.2.4.) 5 ml di acqua distillata sterile in uno delle provette contenenti la coltura madre (5.4.2.) e lavare con un'ansa sterile l'agar a becco di clarino per prelevare le spore. Tale sospensione di spore deve essere mantenuta a 0-5°C ed usata entro 36 ore.

5.5.3. Trasferire con una pipetta sterile (4.2.4.) 0,5 ml della sospensione di spore (5.5.2.) su una piastra preparata (5.5.1.) e spandere bene l'inoculo su tutta la superficie con una bacchetta di vetro piegata ad una estremità. Incubare al 63 ± 1°C (4.1.1.) per 16-18 ore.

Quando si usano una coltura madre (4.3.2.) o una coltura preparata da più di 36 ore, occorre ripetere almeno due volte il procedimento di inoculo con un intervallo di non più di 36 ore fra due subcolture successive.

5.5.4. Con una pipetta sterile (4.2.4.), versare 10 ml di acqua distillata sulla piastra (5.5.3.) e trasferire le spore della superficie nella sospensione servendosi di una bacchetta di vetro.

Versare la sospensione di spore in una bottiglia (4.2.3.) contenente 250 ml di acqua distillata sterile. Chiudere la bottiglia ed agitarla accuratamente. Le colture che non è possibile replicare subito devono essere conservate in frigorifero a 0-6°C.

5.5.5. La sospensione di spore deve dare una conta di colonie vive comprese tra 5 e 10 milioni per millilitro dopo incubazione a 63 ± 1°C per 16-18 ore su terreno agarizzato per il conteggio in piastra. La sospensione di spore deve essere uniformemente torbida e se contiene flocculazioni o un sedimento deve essere scartata e sostituita con una nuova sospensione preparata con la coltura madre (4.3.2.).

5.6. Preparazione delle provette/ampolle

5.6.1. Fondere il terreno agarizzato (5.1.2.) e lasciarlo raffreddare a 55°C.

5.6.2. Aggiungere una parte della sospensione di spore preparata da poco (5.5.4.) a 5 parti del terreno agarizzato (5.6.1.) in una provetta o una bottiglia e mescolare accuratamente.

5.6.3. Trasferire in una provetta o una ampolla sterili (4.2.6.) 0,3 ml del terreno colturale inoculato (5.6.2.) calcolato in modo da formare uno strato dello spessore di 5 mm e chiudere con un tappo o un cappuccio oppure saldando l'estremità alla fiamma. Lasciare raffreddare le

provette/ampolle in posizione verticale facendo solidificare il terreno e lasciare poi a riposo per almeno 12 ore.

5.6.4. Le provette/ampolle possono essere usate lo stesso giorno, ma possono essere conservate per diversi mesi se vengono raffreddate subito dopo la preparazione e conservate a 0-6°C.

6. PROCEDIMENTO

6.1. I campioni devono essere analizzati al più presto possibile, preferibilmente entro 24 ore dal campionamento, mantenendoli nel frattempo alla temperatura di 0-5°C. Nel caso non sia possibile analizzarli entro 24 ore, i campioni devono essere conservati in un surgelatore (da -30°C a -15°C) per ridurre al massimo l'inattivazione della penicillina.

6.2. Contrassegnare ciascuna provetta/ampolla (5.6.) in modo leggibile e indelebile. Togliere il cappuccio o il tappo. Porre in un'opportuna rastrelliera (4.1.3.) il numero necessario di provette/ampolle per i campioni per la prova e quelli di controllo (5.2 e 5.3) da esaminare.

6.3. Aggiungere ad ogni provetta/ampolla 50 mcl della sostanza nutritiva di cui al punto 5.1.4..

6.4. Mescolare a fondo il campione di latte e trasferirne con la siringa (4.1.4.) 0,1 ml nella provetta/ampolla con l'etichetta corrispondente. Usare una punta monouso pulita per ciascun campione da trasferire.

6.5. Ripetere in doppio l'operazione di cui al punto 6.4 usando invece del campione di latte (5.2.3.) la soluzione standard di penicillina contenente 0,004 ug/ml (= 0,0067 ui/ml) di penicillina.

6.6. Ripetere in doppio l'operazione del punto 6.4. usando invece del campione di latte il latte di controllo esente da inibitori (5.3.).

6.7. Chiudere le provette/ampolle e sistemare la rastrelliera che le contiene in bagnomaria a 63 ± 1°C (4.1.2.) per almeno 2 1/2 - 2 3/4 ore.

6.8. Estrarre dal bagnomaria la rastrelliera contenente le provette/fiale.

6.9. Osservare il colore del substrato del saggio (cfr. 7).

7. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

7.1. Una colorazione purpurea del terreno di coltura di prova in una provetta/ampolla contenente il campione di latte o il latte di controllo indica la presenza nel campione di antibiotici o di sulfamidici esattamente o vicino al livello "totalmente positivo" indicato nella tabella 1. Il permanere della colorazione purpurea nelle provette/ampolle contenenti la soluzione standard di penicillina (6.5.) dimostra che il terreno di coltura adottato per il saggio à sufficientemente sensibile.

7.2. La colorazione purpurea solo di una parte del terreno di coltura o la colorazione irregolare di una delle provette/fiale contenenti il campione di latte indicano la presenza nel campione di sostanze inibenti comprese fra i livelli indicati nella tabella 1.

7.3. Una colorazione giallastra del terreno di coltura in una delle provette/ampolle del campione di latte o del latte di controllo indica l'assenza di sostanze che inibiscono la crescita dell'organismo-test.

7.4. Se tutte le provette/ampolle, compresa quella con il latte di controllo, acquistano una colorazione purpurea, queste non contengono spore vive ed occorre ripetere il saggio sui campioni usando sostanze preparate di recente.

8. CONFERMA DEI RISULTATI

8.1. Effettuare su tutti i campioni che danno le reazioni descritte in 7.1. e 7.2. la prova di conferma secondo il "metodo B".
Se prima della prova di conferma è necessario procedere al deposito dei campioni di latte questi ultimi debbono essere surgelati per impedire la degradazione degli antibiotici.

B. METODO PER LA CONFERMA DELLE PENICILLINE E LA DETERMINAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE

1. OGGETTO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Il procedimento descrive il saggio di conferma per penicilline o per antibiotici diversi dalle penicilline ed il metodo per determinare la concentrazione della penicillina nei campioni di latte con reazione positiva (A.7.1.) o incerta (A.7.2.).

Sensibilità del metodo ai vari antibiotici

Cfr. A.1.

2. DEFINIZIONE

2.1. Il campione di latte contiene antibiotici, sulfamidici compresi, quando con il metodo descritto il campione presenta attorno al disco un alone di inibizione largo almeno 2 mm.

2.2. Se un campione contenente antibiotici, sulfamidici compresi (2.1.), cui è stata aggiunta penicillinasi (betalattamasi) non dà alone oppure dà un alone di diametro inferiore a quello del campione senza penicillinasi, la sostanza inibente è la penicillina con o senza un altro antibiotico, sulfamidici compresi.

2.3. Se la zona non viene inattivata dalla penicillinasi (2.2.), la sostanza inibente nel campione di latte non è penicillina, ma puo' essere un altro residuo (cfr. direttiva 85/397/CEE allegato A, capitolo VI, A.1.f e 2b , allegata al decreto ministeriale 14 maggio 1988, n. 212) pubblicato nel S.O. alla Gazzetta Ufficiale n. 142 del 18 giugno 1988.

Alcune penicilline semisintetiche, ad esempio la sodio cloxacillina socica, non sono, o sono soltanto in parte, inattivate dalla penicillinasi oppure sono completamente resistenti e non sono quindi identificate come penicillina (cfr. 7.3.).

3. PRINCIPIO

Un disco di carta bibula impregnato del latte in esame è posto sulla superficie di un terreno agarizzato inoculato con Bacillus stearothermophilus, varietà calidolactis. Quando con l'incubazione si ha un normale crescita dell'organismo l'agar diventa opaco. La presenza nel latte di sostanze che inibiscono lo sviluppo degli organismi è indicata da un alone attorno al disco. La dimensione dell'alone dipende, tra l'altro, dalla concentrazione e dal tipo di sostanze inibenti presenti nel latte.

4. APPARECCHIATURA, VETRERIA E ATTREZZATURA

4.1. Apparecchiatura

4.1.1. Cfr. A.4.1.

4.1.2. Bagnomaria, regolabile a 80° ± 1° C.

4.2. Vetreria

Cfr. A.4.2.

4.3. Dischi di carta, esenti da sostanze inibenti, di 9-13 mm di diametro, in grado di assorbire circa 130 mg di latte (di preferenza conservati in un essiccatore).

5. TERRENI COLTURALI, SOLUZIONI STANDARD, SOLUZIONE DI PENICILLINASI, REAGENTI, ORGANISMO-TEST, ECC.

Gli ingredienti dei terreni colturali devono essere del tipo per batteriologia. L'acqua usata deve essere distillata su vetro o demineralizzata di purezza almeno equivalente e non deve contenere sostanze che possano inibire la crescita del microrganismo-test.

5.1. Terreni colturali

5.1.1. Agar nutritivo (A.5.1.1.)

5.1.2. Terreno di coltura per la ricerca di sostanze inibenti

Composizione

Estratto di lievito	2,5 g
Triptone	5 g
Glucosio	1 g
Soluzione di trimetoprim o tetroxoprim (A.5.1.3.)	10 ml
Agar (a seconda del potere gelatinizzante)	10-15 g
Acqua	1000 ml

Preparazione

Sciogliere completamente gli ingredienti solidi in acqua riscaldando ed agitando prima di aggiungere la soluzione di trimetoprim o di tetroxoprim. Aggiustare quindi il pH in modo che dopo la sterilizzazione il suo valore a 25°C sia 8,0 + 0,1. Sterilizzare il terreno per 15 minuti a 121 + 1° C.

5.2. Soluzioni standard di penicillina nel latte
(cfr A.5.2)

Per quantificare le sostanze inibenti (8.) preparare delle soluzioni standard di penicillina con latte esente da sostanze inibenti (A.5.3.) alle seguenti concentrazioni :

a) 0,004 ug/ml (0,0067 ui/ml)
b) 0,006 ug/ml (0,01 ui/ml)
c) 0,03 ug/ml (0,05 ui/ml)
d) 0,06 ug/ml (0,1 ui/ml)

5.3. Soluzione di penicillinasi

5.3.1. Sciogliere in acqua distillata sterile una quantità di penicillinasi (betalattamasi) sufficiente a dare una concentrazione di 1000 U/ml. Tal soluzione, di preferenza ripartita in piccole aliquota, puo' essere conservata a 0-5°C al massimo per 4 settimane.

Nota : **Non esiste uno standard internazionale per la penicillinasi. Per il presente metodo si assume che 10 unità di penicillinasi siano sufficienti ad inattivare 0,6 ug (= 1 lU) di penicillina. Per le preparazioni di penicillinasi di cui non si conosce la concentrazione occorrerà verificare se tale supposizione è valida. In caso contrario, occorrerà correggere opportunamente la concentrazione della soluzione di penicillinasi.**

5.3.2. Invece della soluzione di penicillinasi, possono essere usati dischi reperibili in commercio preparati con penicillinasi a condizione che venga effettuato un controllo per verificare che contengano un'adeguata quantità di penicillinasi.

5.4. Organismo-test

Cfr. A.5.4.

5.5. Coltura per il saggio (sospensione di spore)

Cfr. A.5.5.

5.6. Preparazione delle piastre per il saggio

5.6.1. Far fondere il terreno di coltura per la ricerca delle sostanze inibenti (5.1.2.) e lasciare raffreddare a 55°C.

5.6.2. In una bottiglia aggiungere una parte della sospensione di spore preparata da poco (5.5.) a tante parti del terreno colturale per la ricerca delle sostanze inibenti (5.1.2.) quante sono necessarie per ottenere un'opportuna densità delle colonie nel substrato inoculato e mescolare a fondo.

5.6.3. Trasferire in una piastra di Petri sterile (A.4.2.2.), previamente riscaldata a 55°C, il terreno di coltura inoculato (5.6.2.), in modo da formare uno strato dello spessore da 0,6 a 0,8 mm. In una piastra di Petri del diametro interno di 140 mm occorrono circa 15 ml del terreno di coltura per ottenere uno spessore di 0,8 mm.

5.6.4. Trasferire le piastre di Petri su una superficie orizzontale fredda controllata precedentemente con una livella a bolla d'aria, togliere i coperchi e lasciare solidificare il terreno agarizzato. Appena il substrato è solidificato, ricoprire le piastre con i coperchi e capovolgerle per ridurre al massimo la condensazione sulla superficie del terreno agarizzato.

5.6.5. Le piastre così preparate devono essere usate di preferenza il giorno stesso, ma possono essere utilizzate entro due settimane purchè appena preparate vengano immediatamente conservate a 5°C in un sacchetto di polietilene sigillato.

5.6.6. Contrassegnare il fondo delle piastre per poter identificare i campioni.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione dei campioni

6.1.1. I campioni che danno risultati positivi o incerti con il "metodo A" (A.7.1 e A.7.2.) devono essere nuovamente esaminati, per identificare e quantificare la penicillina.

6.1.2. Riscaldare inizialmente questi campioni di latte a 80 $\pm$ 1°C per 10 minuti, in modo da evitare l'influenza di sostanze inibenti termolabili non specifiche.

6.1.3. Dopo aver mescolato energicamente, trasferire circa 10 ml del latte in esame riscaldato in un'appropriata bottiglia sterile a collo largo. Addizionare circa 0,4 ml della soluzione di penicillinasi (5.3.) e mescolare a fondo.

6.2. Ricerca delle sostanze inibenti

6.2.1. Immergere un disco di carta (4.3.) nel campione di latte (6.1.2.) usando un paio di pinzette pulite e asciutte. Eliminare il latte in eccesso premendo il disco contro le pareti della bottiglia contenente il campione. Deporre il disco in piano sulla superficie della piastra (5.6) e premere leggermente con le pinzette.

6.2.2. I dischi preparati con i vari campioni di latte devono essere posti ad una distanza di almeno 20 mm l'uno dall'altro e di almeno 10 mm dal bordo.

6.2.3. Per il controllo della sensibilità, occorre porre a caso tra i dischi del campione di latte alcuni dischi (4.3.) precedentemente immersi nella soluzione standard di penicillina (5.2.a.); questi devono essere almeno il 2% di quelli del campione di latte e per ciascun saggio ne devono essere impiegati almeno 5.

6.2.4. Dopo aver disposto a caso tutti i dischi sul terreno agarizzato ed averli contrassegnati, capovolgere le piastre ed incubarle a 63 ± 1°C per 2,5-5 ore.

6.2.5. Dopo l'incubazione le piastre vengono esaminate contro un'opportuna sorgente luminosa per individuare gli aloni di inibizione attorno ai dischi di carta. Si misurano quindi tali aloni.

6.2.6. Gli aloni attorno ai dischi contenenti la soluzione standard di penicillina (6.2.3) devono essere larghi almeno 2 mm.

6.2.7. L'esistenza di aloni chiari attorno ai dischi contenenti il campione di latte di grandezza pari o maggiore a quella di cui in 6.2.6. indica la presenza di sostanze inibenti l'organismo test.

6.3. <u>Identificazione e determinazione quantitativa della sostanza inibente</u>

6.3.1. Effettuare in doppio il procedimento 6.2.1. su un campione di latte riscaldato (6.1.2.) e su un campione trattato con penicillinasi (6.1.3.). Invece di aggiungere penicillinasi a 10 ml del campione di latte si può immergere in questo campione un disco preparato con penicillinasi (5.3.2.) per poi disporlo nella piastra per il saggio.

6.3.2. Effettuare in doppio il procedimento 6.2.1. per ciascuna delle soluzioni standard di penicillina elencate in 5.2.a-d.

6.3.3. Determinare i diametri medi degli aloni di inibizione per il campione di latte, per il controllo di penicillinasi e per le soluzioni standard di penicillina.

7. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI (cfr. 2)

7.1. Se l'alone non si forma attorno al disco contenente il controllo di penicillinasi ma si forma attorno a quello che contiene il campione di latte ed ha dimensioni uguali o maggiori a quelle dell'alone che circonda il disco imbibito di soluzione standard di penicillina (5.2.a.), la sostanza inibente presente nel campione di latte corrisponde ad una concentrazione di almeno 0,004 ug/ml di benzilpenicillina sodica o potassica.

7.2. Se il diametro medio dell'alone attorno al disco contenente la penicillinasi è uguale al diametro medio dell'alone attorno al disco contenente il campione di latte, il latte contiene sostanze inibenti che non possono essere inattivate con le concentrazioni di penicillinasi usate nel presente procedimento.

7.3. Se il diametro medio dell'alone attorno al disco contenente la penicillinasi è inferiore al diametro medio dell'alone attorno al disco contenente soltanto il campione di latte, riscaldato come descritto in 6.1.2., il campione di latte contiene penicillina associata ad altri antibiotici, sulfamidici compresi, oltre a penicillina o penicillina semi-sintetica, che non puo' essere identificata con la concentrazione di penicillinasi usata nel presente procedimento. Le penicilline sintetiche, quali la cloxacillina sodica, non possono essere inattivate dalla penicillinasi nelle condizioni del saggio e possono pertanto essere classificate come sostanze inibenti diverse dalla penicillina.

Nota: Le sostanze inibenti diverse dalla penicillina possono eventualmente essere identificate ricorrendo ad opportuni metodi.

8. DETERMINAZIONE DEL TENORE DI PENICILLINA

8.1. Il tenore di penicillina puo' essere determinato tracciando una curva standard oppure puo' essere calcolato dalle dimensioni dell'alone ottenuto con le soluzioni standard di penicillina nel latte (5.2.a-d).

8.2. Determinazione della curva standard

Poichè si ha una correlazione lineare tra il $\log_{10}$ della concentrazione della penicillina ed il diametro degli aloni di inibizione, la curva standard puo' essere tracciata su carta semilogaritmica con le concentrazioni di penicillina in ordinata e gli aloni di inibizione in ascissa. Questi vengono calcolati come media delle prove in doppio. I diametri degli aloni di inibizione vengono riportati in funzione delle concentrazioni standard di penicillina e si ottiene la curva standard.

8.3. Calcolo

Le concentrazioni di penicillina nel campione di latte possono essere calcolate dai diametri degli aloni usando l'equazione o la curva standard. Per prove precise il raggio degli aloni di inibizione deve essere non inferiore a due volte e non superiore a cinque volte il raggio dei dischi.

9. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

9.1. I risultati si esprimono come tenore di penicillina uguale o superiore a 0,004 ug/ml (oppure indicando la concentrazione determinata) oppure come tenore di sostanze inibenti diverse dalla penicillina.

9.2. Ripetibilità (r) e riproducibilità (R)

I valori relativi non sono disponibili né sarebbero significativi dato che si effettua il confronto utilizzando uno standard.

IX. DETERMINAZIONE DEL TENORE LIPOPOLISACCARIDE BATTERICO - SAGGIO LPS

1. OGGETTO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Il presente procedimento descrive il metodo ufficiale per la determinazione del tenore di lipopolisaccaridi (LPS) del latte. Il metodo si applica al latte UHT ed al latte sterilizzato.

2. DEFINIZIONE

L'esame deve essere effettuato per le specie batteriche che sono più frequentemente causa di malattie trasmesse con gli alimenti.

La pastorizzazione è un trattamento che protegge dalla presenza di agenti patogeni non termoresistenti nel latte. Se le norme fissate nell'allegato A, parte II del decreto ministeriale 14 maggio 1988, n. 212, pubblicato nel S.O. alla Gazzetta Ufficiale n. 142 del 18 giugno 1988 per la conta delle colonie a 30° e a 21°C, per la fosfatasi e per i coliformi sono rispettate, un saggio specifico per gli agenti patogeni è necessario soltanto nel caso si sospetti che il latte sia all'origine dell'insorgenza di casi di intossicazione alimentare.

3. PROCEDIMENTO

Per la ricerca dei microrganismi patogeni si applicano, se esistono, i criteri ed i metodi riconosciuti a livello internazionale.

4. RELAZIONE DEI RISULTATI

Per ogni microrganismo patogeno per il quale è stato effettuato l'esame il risultato deve essere espresso nel modo seguente :

numero per ml di latte oppure "presenza" o "assenza" nel volume di latte pastorizzato richiesto per il metodo adottato.

La relazione deve descrivere chiaramente il metodo adottato.

NOTE

AVVERTENZA:

Il testo delle note qui pubblicato è stato redatto ai sensi dell'art. 10, comma 3, del testo unico delle disposizioni sulla promulgazione delle leggi, sull'emanazione dei decreti del Presidente della Repubblica e sulle pubblicazioni ufficiali della Repubblica italiana, approvato con D.P.R. 28 dicembre 1985, n. 1092, al solo fine di facilitare la lettura delle disposizioni di legge alle quali è operato il rinvio. Restano invariati il valore e l'efficacia degli atti legislativi qui trascritti.

Note alle premesse:

— Il testo dell'art. 6, comma 8, del D.M. 14 maggio 1988, n. 212, è il seguente: «8. Gli accertamenti analitici vengono effettuati con i metodi di analisi ufficialmente riconosciuti ai sensi dell'art. 21 della legge 30 aprile 1962, n. 283, o in loro mancanza, con metodi riconosciuti a livello internazionale».

— Il testo dell'art. 5, comma 1, della legge 3 maggio 1989, n. 169, è il seguente: «1. I metodi di analisi ed eventuali altri esami di controllo, le tolleranze e i criteri di giudizio dei relativi risultati, in relazione ai vari tipi di latte sottoposto a trattamento di pastorizzazione, sono stabiliti ed aggiornati con appositi decreti del Ministro della sanità di concerto con il Ministro dell'agricoltura e delle foreste».

— Il testo dell'art. 6, comma 3, della legge 3 maggio 1989, n. 169, è il seguente: «3. I metodi di analisi o eventuali altri esami di controllo, le tolleranze e i criteri di giudizio dei relativi risultati, in riferimento ai tipi di latte di cui al precedente comma 1, sono stabiliti ed aggiornati con appositi decreti del Ministro della sanità di concerto con il Ministro dell'agricoltura e delle foreste».

— Il testo dell'art. 21 della legge 30 aprile 1962, n. 283, è il seguente:

«La determinazione dei metodi ufficiali di analisi delle sostanze alimentari spetta al Ministro della sanità; a tale scopo è costituita, presso il Ministero della sanità, una Commissione permanente, di cui fanno parte:

a) un rappresentante del Ministero della sanità che la presiede;

(omissis).

Gli elenchi dei metodi ufficiali di analisi dovranno essere revisionati almeno ogni due anni.

La Commissione ha la facoltà di avvalersi dell'opera di esperti particolarmente competenti nelle singole materie in esame».

92A1692

FRANCESCO NIGRO, *direttore*

FRANCESCO NOCITA, *redattore*
ALFONSO ANDRIANI, *vice redattore*

(4651378) Roma - Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato - S.

ISTITUTO POLIGRAFICO E ZECCA DELLO STATO

LIBRERIE DEPOSITARIE PRESSO LE QUALI È IN VENDITA LA GAZZETTA UFFICIALE

ABRUZZO

◇ **CHIETI**
Libreria PIROLA MAGGIOLI
di De Luca
Via A. Herio, 21

◇ **PESCARA**
Libreria COSTANTINI
Corso V. Emanuele, 146
Libreria dell'UNIVERSITÀ
di Lidia Cornacchia
Via Galilei, angolo via Gramsci

◇ **TERAMO**
Libreria IPOTESI
Via Oberdan, 9

BASILICATA

◇ **MATERA**
Cartolibreria
Eredi ditta MONTEMURRO NICOLA
Via delle Beccherie, 69

◇ **POTENZA**
Ed. Libr. PAGGI DORA ROSA
Via Pretoria

CALABRIA

◇ **CATANZARO**
Libreria G. MAURO
Corso Mazzini, 89

◇ **COSENZA**
Libreria DOMUS
Via Monte Santo

◇ **PALMI (Reggio Calabria)**
Libreria BARONE PASQUALE
Via Roma, 31

◇ **REGGIO CALABRIA**
Libreria PIROLA MAGGIOLI
di Fiorelli E.
Via Buozzi, 23

◇ **SOVERATO (Catanzaro)**
Rivendita generi Monopolio
LEOPOLDO MICO
Corso Umberto, 144

CAMPANIA

◇ **ANGRI (Salerno)**
Libreria AMATO ANTONIO
Via dei Goti, 4

◇ **AVELLINO**
Libreria CESA
Via G. Nappi, 47

◇ **BENEVENTO**
Libreria MASONE NICOLA
Viale dei Rettori, 71

◇ **CASERTA**
Libreria CROCE
Piazza Dante

◇ **CAVA DEI TIRRENI (Salerno)**
Libreria RONDINELLA
Corso Umberto I, 253

◇ **FORIO D'ISCHIA (Napoli)**
Libreria MATTERA

◇ **NOCERA INFERIORE (Salerno)**
Libreria CRISCUOLO
Traversa Nobile ang. via S. Matteo, 51

◇ **SALERNO**
Libreria ATHENA S.a.s.
Piazza S. Francesco, 66

EMILIA-ROMAGNA

◇ **ARGENTA (Ferrara)**
C.S.P. - Centro Servizi Polivalente S.r.l.
Via Matteotti, 36/B

◇ **FERRARA**
Libreria TADDEI
Corso Giovecca, 1

◇ **FORLÌ**
Libreria CAPPELLI
Corso della Repubblica, 54
Libreria MODERNA
Corso A. Diaz, 2/F

◇ **MODENA**
Libreria LA GOLIARDICA
Via Emilia Centro, 210

◇ **PARMA**
Libreria FIACCADORI
Via al Duomo

◇ **PIACENZA**
Tip. DEL MAINO
Via IV Novembre, 160

◇ **RAVENNA**
Libreria TARANTOLA
Via Matteotti, 37

◇ **REGGIO EMILIA**
Libreria MODERNA
Via Guido da Castello, 11/B

◇ **RIMINI (Forlì)**
Libreria DEL PROFESSIONISTA
di Giorgi Egidio
Via XXII Giugno, 3

FRIULI-VENEZIA GIULIA

◇ **GORIZIA**
Libreria ANTONINI
Via Mazzini, 16

◇ **PORDENONE**
Libreria MINERVA
Piazza XX Settembre

◇ **TRIESTE**
Libreria ITALO SVEVO
Corso Italia, 9/F
Libreria TERGESTE S.a.s.
Piazza della Borsa, 15

◇ **UDINE**
Cartolibreria UNIVERSITAS
Via Prachiuso, 19
Libreria BENEDETTI
Via Mercatovecchio, 13
Libreria TARANTOLA
Via V. Veneto, 20

LAZIO

◇ **APRILIA (Latina)**
Ed. BATTAGLIA GIORGIA
Via Mascagni

◇ **FROSINONE**
Cartolibreria LE MUSE
Via Marittima, 15

◇ **LATINA**
Libreria LA FORENSE
Via dello Statuto, 28/30

◇ **LAVINIO (Roma)**
Edicola di CIANFANELLI A. & C.
Piazza del Consorzio, 7

◇ **RIETI**
Libreria CENTRALE
Piazza V. Emanuele, 8

◇ **ROMA**
AGENZIA 3A
Via Aureliana, 59
Libreria DEI CONGRESSI
Viale Civiltà del Lavoro, 124
Ditta BRUNO E ROMANO SGUEGLIA
Via Santa Maria Maggiore, 121
Cartolibreria ONORATI AUGUSTO
Via Raffaele Garofalo, 33
Libreria GABRIELE MARIA GRAZIA
c/o Chiosco Pretura di Roma
Piazzale Clodio

◇ **SORA (Frosinone)**
Libreria DI MICCO UMBERTO
Via E. Zincone, 28

◇ **TIVOLI (Roma)**
Cartolibreria MANNELLI
di Rosarita Sabatini
Viale Mannelli, 10

◇ **TUSCANIA (Viterbo)**
Cartolibreria MANCINI DUILIO
Viale Trieste

LIGURIA

◇ **IMPERIA**
Libreria ORLICH
Via Amendola, 25

◇ **LA SPEZIA**
Libreria CENTRALE
Via Colli, 5

◇ **SAVONA**
Libreria IL LEGGIO
Via Montenotte, 36/R

LOMBARDIA

◇ **ARESE (Milano)**
Cartolibreria GRAN PARADISO
Via Valera, 23

◇ **BERGAMO**
Libreria LORENZELLI
Viale Papa Giovanni XXIII, 74

◇ **BRESCIA**
Libreria QUERINIANA
Via Trieste, 13

◇ **COMO**
Libreria NANI
Via Cairoli, 14

◇ **CREMONA**
Libreria DEL CONVEGNO
Corso Campi, 72

◇ **MANTOVA**
Libreria ADAMO DI PELLEGRINI
di M. Di Pellegrini e D. Ebbi S.n.c.
Corso Umberto 1, 32

◇ **PAVIA**
GARZANTI Libreria internazionale
Palazzo Università
Libreria TICINUM
Corso Mazzini, 2/C

◇ **SONDRIO**
Libreria ALESSO
Via dei Caimi, 14

◇ **VARESE**
Libreria PIROLA
Via Albuzzi, 8
Libreria PONTIGGIA e C.
Corso Moro, 3

MARCHE

◇ **ANCONA**
Libreria FOGOLA
Piazza Cavour, 4/5

◇ **ASCOLI PICENO**
Libreria MASSIMI
Corso V. Emanuele, 23
Libreria PROPERI
Corso Mazzini, 188

◇ **MACERATA**
Libreria MORICHETTA
Piazza Annessione, 1
Libreria TOMASSETTI
Corso della Repubblica, 11

◇ **PESARO**
LA TECNOGRAFICA
di Mattioli Giuseppe
Via Mameli, 80/82

MOLISE

◇ **CAMPOBASSO**
DI.E.M. Libreria giuridica
c/o Palazzo di Giustizia
Viale Elena, 1

◇ **ISERNIA**
Libreria PATRIARCA
Corso Garibaldi, 115

PIEMONTE

◇ **ALESSANDRIA**
Libreria BERTOLOTTI
Corso Roma, 122
Libreria BOFFI
Via dei Martiri, 31

◇ **ALBA (Cuneo)**
Casa Editrice ICAP
Via Vittorio Emanuele, 19

◇ **ASTI**
Libreria BORELLI TRE RE
Corso Alfieri, 364

◇ **BIELLA (Vercelli)**
Libreria GIOVANNACCI
Via Italia, 6

◇ **CUNEO**
Casa Editrice ICAP
Piazza D. Galimberti, 10

◇ **TORINO**
Casa Editrice ICAP
Via Monte di Pietà, 20
SO.CE.DI. S.r.l.
Via Roma, 80

PUGLIA

◇ **ALTAMURA (Bari)**
JOLLY CART di Lorusso A. & C.
Corso V. Emanuele, 65

◇ **BARI**
Libreria FRANCO MILELLA
Viale della Repubblica, 16/B
Libreria LATERZA e LAVIOSA
Via Crisanzio, 16

◇ **BRINDISI**
Libreria PIAZZO
Piazza Vittoria, 4

◇ **CORATO (Bari)**
Libreria GIUSEPPE GALISE
Piazza G. Matteotti, 9

◇ **FOGGIA**
Libreria PATIERNO
Portici Via Dante, 21

◇ **LECCE**
Libreria MILELLA
Via Palmieri, 30

◇ **MANFREDONIA (Foggia)**
IL PAPIRO - Rivendita giornali
Corso Manfredi, 126

◇ **TARANTO**
Libreria FUMAROLA
Corso Italia, 229

SARDEGNA

◇ **ALGHERO (Sassari)**
Libreria LOBRANO
Via Sassari, 65

◇ **CAGLIARI**
Libreria DESSÌ
Corso V. Emanuele, 30/32

◇ **NUORO**
Libreria DELLE PROFESSIONI
Via Manzoni, 45/47

◇ **ORISTANO**
Libreria SANNA GIUSEPPE
Via del Ricovero, 70

◇ **SASSARI**
MESSAGGERIE SARDE
Piazza Castello, 10

SICILIA

◇ **AGRIGENTO**
Libreria L'AZIENDA
Via Callicratide, 14/16

◇ **CALTANISSETTA**
Libreria SCIASCIA
Corso Umberto I, 36

◇ **CATANIA**
ENRICO ARLIA
Rappresentanze editoriali
Via V. Emanuele, 62
Libreria GARGIULO
Via F. Riso, 56/58
Libreria LA PAGLIA
Via Etnea, 393/395

◇ **ENNA**
Libreria BUSCEMI G. B.
Piazza V. Emanuele

◇ **FAVARA (Agrigento)**
Cartolibreria MILIOTO ANTONINO
Via Roma, 60

◇ **MESSINA**
Libreria PIROLA
Corso Cavour, 47

◇ **PALERMO**
Libreria FLACCOVIO DARIO
Via Ausonia, 70/74
Libreria FLACCOVIO LICAF
Piazza Don Bosco, 3
Libreria FLACCOVIO S.F.
Piazza V. E. Orlando, 15/16

◇ **RAGUSA**
Libreria E. GIGLIO
Via IV Novembre, 39

◇ **SIRACUSA**
Libreria CASA DEL LIBRO
Via Maestranza, 22

◇ **TRAPANI**
Libreria LO BUE
Via Cassio Cortese, 8

TOSCANA

◇ **AREZZO**
Libreria PELLEGRINI
Via Cavour, 42

◇ **FIRENZE**
Libreria MARZOCCO
Via de— Martelli, 22 R

◇ **GROSSETO**
Libreria SIGNORELLI
Corso Carducci, 9

◇ **LIVORNO**
Libreria AMEDEO NUOVA
di Quilici Irma & C. S.n.c.
Corso Amedeo, 23/27

◇ **LUCCA**
Libreria BARONI
Via S. Paolino, 45/47
Libreria Prof.le SESTANTE
Via Montanara, 9

◇ **MASSA**
GESTIONE LIBRERIE
Piazza Garibaldi, 8

◇ **PISA**
Libreria VALLERINI
Via dei Mille, 13

◇ **PISTOIA**
Libreria TURELLI
Via Macallè, 37

◇ **SIENA**
Libreria TICCI
Via delle Terme, 5/7

TRENTINO-ALTO ADIGE

◇ **BOLZANO**
Libreria EUROPA
Corso Italia, 6

◇ **TRENTO**
Libreria DISERTORI
Via Diaz, 11

UMBRIA

◇ **FOLIGNO (Perugia)**
Libreria LUNA di Verri e Bibi s.n.c.
Via Gramsci, 41

◇ **PERUGIA**
Libreria SIMONELLI
Corso Vannucci, 82

◇ **TERNI**
Libreria ALTEROCCA
Corso Tacito, 29

VENETO

◇ **BELLUNO**
Cartolibreria BELLUNESE
di Baldan Michela
Via Loreto, 22

◇ **PADOVA**
Libreria DRAGHI - RANDI
Via Cavour, 17

◇ **ROVIGO**
Libreria PAVANELLO
Piazza V. Emanuele, 2

◇ **TREVISO**
Libreria CANOVA
Via Calmaggiore, 31

◇ **VENEZIA**
Libreria GOLDONI
Calle Goldoni 4511

◇ **VERONA**
Libreria GHELFI & BARBATO
Via Mazzini, 21
Libreria GIURIDICA
Via della Costa, 5

◇ **VICENZA**
Libreria GALLA
Corso A. Palladio, 41/43

MODALITÀ PER LA VENDITA

La «Gazzetta Ufficiale» e tutte le altre pubblicazioni ufficiali sono in vendita al pubblico:

- **presso l'Agenzia dell'Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato in ROMA, piazza G. Verdi, 10;**
- **presso le Concessionarie speciali di:**
  BARI, Libreria Laterza S.p.a., via Sparano, 134 - BOLOGNA, Libreria Ceruti, piazza dei Tribunali, 5/F - FIRENZE, Libreria Pirola (Etruria S.a.s.), via Cavour, 46/r - GENOVA, Libreria Baldaro, via XII Ottobre, 172/r - MILANO, Libreria concessionaria «Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato» S.r.l., Galleria Vittorio Emanuele, 3 - NAPOLI, Libreria Italiana, via Chiaia, 5 - PALERMO, Libreria Flaccovio SF, via Ruggero Settimo, 37 - ROMA, Libreria Il Tritone, via del Tritone, 61/A - TORINO, Cartiere Miliani Fabriano - S.p.a., via Cavour, 17;
- **presso le Librerie depositarie indicate nella pagina precedente.**

Le richieste per corrispondenza devono essere inviate all'Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato - Direzione Marketing e Commerciale - Piazza G. Verdi, 10 - 00100 Roma, versando l'importo, maggiorato delle spese di spedizione, a mezzo del c/c postale n. 387001. Le inserzioni, come da norme riportate nella testata della parte seconda, si ricevono in Roma (Ufficio inserzioni - Piazza G. Verdi, 10). Le suddette librerie concessionarie speciali possono accettare solamente gli avvisi consegnati a mano e accompagnati dal relativo importo.

PREZZI E CONDIZIONI DI ABBONAMENTO - 1992

Gli abbonamenti annuali hanno decorrenza dal 1° gennaio al 31 dicembre 1992
i semestrali dal 1° gennaio al 30 giugno 1992 e dal 1° luglio al 31 dicembre 1992

ALLA PARTE PRIMA - LEGISLATIVA

Ogni tipo di abbonamento comprende gli indici mensili

Tipo A - Abbonamento ai fascicoli della serie generale, inclusi i supplementi ordinari:		
	- annuale	L. 330.000
	- semestrale	L. 180.000
Tipo B - Abbonamento ai fascicoli della serie speciale destinata agli atti dei giudizi davanti alla Corte costituzionale:		
	- annuale	L. 60.000
	- semestrale	L. 42.000
Tipo C - Abbonamento ai fascicoli della serie speciale destinata agli atti delle Comunità europee:		
	- annuale	L. 185.000
	- semestrale	L. 100.000
Tipo D - Abbonamento ai fascicoli della serie speciale destinata alle leggi ed ai regolamenti regionali:		
	- annuale	L. 60.000
	- semestrale	L. 42.000
Tipo E - Abbonamento ai fascicoli della serie speciale destinata ai concorsi indetti dallo Stato e dalle altre pubbliche amministrazioni:		
	- annuale	L. 185.000
	- semestrale	L. 100.000
Tipo F - Abbonamento ai fascicoli della serie generale, inclusi i supplementi ordinari, e i fascicoli delle quattro serie speciali:		
	- annuale	L. 635.000
	- semestrale	L. 350.000

Integrando il versamento relativo al tipo di abbonamento della Gazzetta Ufficiale, *parte prima, prescelto con la somma di L. 80.000, si avrà diritto a ricevere l'Indice repertorio annuale cronologico per materie 1992.*

Prezzo di vendita di un fascicolo della *serie generale*	L. 1.200
Prezzo di vendita di un fascicolo delle *serie speciali I, II e III*, ogni 16 pagine o frazione	L. 1.200
Prezzo di vendita di un fascicolo della *IV serie speciale «Concorsi ed esami»*	L. 2.400
Prezzo di vendita di un fascicolo *indici mensili*, ogni sedici pagine o frazione	L. 1.200
Supplementi ordinari per la vendita a fascicoli separati, ogni 16 pagine o frazione	L. 1.300
Supplementi straordinari per la vendita a fascicoli separati, ogni 16 pagine o frazione	L. 1.300

Supplemento straordinario «Bollettino delle estrazioni»

Abbonamento annuale	L. 115.000
Prezzo di vendita di un fascicolo ogni 16 pagine o frazione	L. 1.300

Supplemento straordinario «Conto riassuntivo del Tesoro»

Abbonamento annuale	L. 75.000
Prezzo di vendita di un fascicolo	L. 7.000

Gazzetta Ufficiale su MICROFICHES - 1992
(Serie generale - Supplementi ordinari - Serie speciali)

Abbonamento annuo mediante 52 spedizioni settimanali raccomandate	L. 1.300.000
Vendita singola: per ogni microfiches fino a 96 pagine cadauna	L. 1.500
per ogni 96 pagine successive	L. 1.500
Spese per imballaggio e spedizione raccomandata	L. 4.000

N.B. — Le microfiches sono disponibili dal 1° gennaio 1983. — Per l'estero i suddetti prezzi sono aumentati del 30%

ALLA PARTE SECONDA - INSERZIONI

Abbonamento annuale	L. 295.000
Abbonamento semestrale	L. 160.000
Prezzo di vendita di un fascicolo, ogni 16 pagine o frazione	L. 1.300

I prezzi di vendita, in abbonamento ed a fascicoli separati, per l'estero, nonché quelli di vendita dei fascicoli delle annate arretrate, compresi i fascicoli dei supplementi ordinari e straordinari, sono raddoppiati.

L'importo degli abbonamenti deve essere versato sul c/c postale n. 387001 intestato all'Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato. L'invio dei fascicoli disguidati, che devono essere richiesti all'Amministrazione entro 30 giorni dalla data di pubblicazione, è subordinato alla trasmissione di una fascetta del relativo abbonamento.

Per informazioni o prenotazioni rivolgersi all'Istituto Poligrafico e Zecca dello Stato - Piazza G. Verdi, 10 - 00100 ROMA
abbonamenti ☎ (06) 85082149/85082221 - vendita pubblicazioni ☎ (06) 85082150/85082276 - inserzioni ☎ (06) 85082145/85082189

L. 7.800